

PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/107525>

Please be advised that this information was generated on 2018-07-08 and may be subject to change.

Het cytopathologische effect van
enige virussen in gecultiveerd
lensepitheel en de permeabiliteit
van de lenskapsel voor virussen

G. H. W. L. Sloot

HET CYTOPATHIOLOGISCHE EFFECT
VAN ENIGE VIRUSSEN
IN GECULTIVEERD LENSEPITHEEL
EN
DE PERMEABILITEIT VAN DE LENSAPSEL
VOOR VIRUSSEN

PROMOTOR:
PROF. DR. J. E. A. VAN DEN HEUVEL

HET CYTOPATHOLOGISCHE EFFECT
VAN ENIGE VIRUSSEN
IN GECULTIVEERD LENSEPITHEEL
EN
DE PERMEABILITEIT VAN DE LENS KAPSEL
VOOR VIRUSSEN

Een experimenteel onderzoek

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE R.K. UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. J. H. TERLINGEN,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE,
VOLGENS HET BESLUIT VAN DE SENAAT
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP VRIJDAG 6 OCTOBER 1961,
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

GEERT HENNY WILLY LUCY SLOOT
GEBOREN TE SCHIEDAM

CENTRALE DRUKKERIJ N.V., NIJMEGEN

Aan mijn ouders

Aan mijn vrouw

INHOUD

| | |
|--|----|
| Inleiding | 7 |
| Hoofdstuk I. | |
| De plaats van de weefselcultuur in de virologie . | 9 |
| Hoofdstuk II. | |
| De techniek van het kweken van lensepitheel in weefselcultures . | 12 |
| Hoofdstuk III. | |
| De techniek van het gekleurde preparaat van het lensepitheel in de weefselkweek . . . | 16 |
| Hoofdstuk IV. | |
| De beoordeling van lensepitheelcellen in het gekleurde preparaat van normaal groeiende weefselcultures . . . | 20 |
| Hoofdstuk V. | |
| Het beënten van lensepitheel in weefselcultures met verschillende virussen | 26 |
| De adenovirussen . | 27 |
| Poliovirus . | 36 |
| Mazelenvirus | 38 |
| Het vacciniavirus | 42 |
| Hoofdstuk VI. | |
| Algemeen literatuuroverzicht over de structuur en de permeabiliteit van de lenskapsel . | 47 |
| | 75 |

Hoofdstuk VII.

| | |
|---|----|
| De doorlaatbaarheid van de lenskapsel voor virussen . . . | 51 |
| Apparatuur | 52 |
| Eigen experimenten | 57 |
| A. Controle van de proefopstelling | 57 |
| B. Adsorptie en penetratie van virus | 58 |

Hoofdstuk VIII.

| | |
|---------------------------|----|
| Samenvatting | 65 |
| Summary | 69 |
| Literatuurlijst | 72 |

INLEIDING

Het doel van dit onderzoek was de bestudering van de doorlaatbaarheid van de lenskapsel voor virussen en de mogelijkheid van virusinfectie van de lens.

Voor de bestudering van de permeabiliteit moest allereerst de vatbaarheid van lenscellen voor virusinfecties onderzocht worden.

Het cytologisch onderzoek van weefselcultures, zoals deze in het virologisch laboratorium worden gebruikt voor de identificering van virussen, werd door ons toegepast voor lensepitheel.

Bij onze experimenten zijn wij uitgegaan van de volgende vraagstelling:

1. Is een cytopathologisch effect waarneembaar, indien lensepitheel wordt geïnfecteerd met virus?
2. Is er differentiatie van verschillende virussen mogelijk op grond van het waar te nemen cytopathologische effect?
3. Is de lenskapsel permeabel voor virussen en is dit door middel van het cytopathologische effect aantoonbaar?

De volgorde, waarin onze experimenten gedaan werden, blijkt uit de hier onder volgende hoofdstukken.

In het eerste hoofdstuk wordt in het kort de plaats die de weefselkweek in de virologie inneemt besproken.

In het tweede hoofdstuk wordt de door ons gebruikte techniek van het kweken van lensepitheel uiteengezet.

Hoofdstuk III beschrijft de techniek van het gekleurde preparaat van het gecultiveerde lensepitheel.

In het vierde hoofdstuk wordt het beeld besproken van lensepitheelcellen in normaal groeiende weefselcultures in het gefixeerde en gekleurde preparaat.

Hoofdstuk V is gewijd aan het beënten van lensepitheel in weefselcultures met verschillende virussen. De resultaten van de entingen worden besproken.

In het zesde hoofdstuk wordt aan de hand van de literatuur een beschouwing gewijd aan de structuur en de permeabiliteit van de lenskapsel.

In het zevende hoofdstuk volgt dan een uitvoerige beschrijving van de door ons gebruikte proefopstelling en worden de verkregen resultaten besproken.

In een laatste hoofdstuk worden onderzoeken, de verkregen resultaten en de conclusies nog eens samengevat.

HOOFDSTUK I

DE PLAATS VAN DE WEEFSELCULTUUR IN DE VIROLOGIE

Een virus is een obligatoire parasiet van levende cellen. Om zich te kunnen vermenigvuldigen heeft een virus een levende cel nodig van een daarvoor gevoelig weefsel, afkomstig van een voor het virus gevoelig dier of mens.

Verliest het virus het contact met deze levende cellen, dan kan het snel te gronde gaan, of tegen dit verlies in enige mate resistent blijken te zijn; in beide gevallen echter is vermenigvuldiging uitgesloten indien het virus niet bijtijds een gevoelige cel kan binnendringen.

Dit cellulair parasitisme heeft voor ons een directe praktische betekenis: de onmogelijkheid een virus te kweken op een voedingsbodem zoals wij in de bacteriologie gebruiken.

Om een virus in het laboratorium te conserveren, te bestuderen en te doen vermenigvuldigen, moeten wij dus de beschikking hebben over een gevoelig proefdier of een weefselcultuur die voor dit virus gevoelig blijkt te zijn.

Het is evenzeer nodig, dat deze gevoelige cellen in leven zijn en dat de celkern nog in staat is zich door mitose te delen. Ook wanneer deze gevoelige cellen bv. tengevolge van een intoxicatie met colchicine of röntgenbestraling een zodanige verandering van de kern hebben ondergaan, dat ze wel niet te gronde gaan, maar zich niet meer kunnen delen, dan ziet men dat een dergelijke cel, alhoewel nog gevoelig voor het virus, toch niet meer kan dienen voor vermenigvuldiging hiervan.

Wij zien dus dat vermenigvuldiging van virus nauw gebonden is aan het functioneren van de gastheercel, in het bijzonder aan zijn kernmetabolisme.

Deze onmogelijkheid, virus te kweken buiten levende cellen, is gedurende meer dan een halve eeuw een ernstige belemmering geweest voor de ontwikkeling van de virologie.

Hoewel het reeds enige tientallen jaren geleden is gelukt sommige

virussen in weefselcultuur te kweken, bedienden de virologen zich op een enkele uitzondering na niet van de weefselkweektechniek. Deze werd slechts gebruikt voor enige onderzoekingen van fundamentele problemen. In het algemeen maakte men liever gebruik van bekende, voor virussen gevoelige proefdieren.

Sinds een tiental jaren echter heeft de weefselkweektechniek zich in de virologie een zeer belangrijke plaats veroverd.

Drie gewichtige omstandigheden hebben tot deze ontwikkeling bijgedragen.

Ten eerste het inzicht omstreeks 1950 dat vele virussen bij hun vermenigvuldiging in de cellen van de weefselcultuur degeneratieve veranderingen veroorzaken, welke gemakkelijk kunnen worden vastgesteld. Dit phenomeen was reeds eerder door enige onderzoekers (TOPACIO en HYDE 1932, HUANG 1942) beschreven; de betekenis werd echter pas omstreeks 1950 algemeen duidelijk, toen bleek dat voor de bestudering van dit z.g. cytopathologische effect het dier-experiment in het geheel niet nodig was. Het bleek dat bepaalde morfologische celveranderingen typisch waren voor bepaalde virussen en als bewijs konden gelden voor hun aanwezigheid. Toevoeging van specifieke antilichamen aan de weefselcultuur tegelijk met de inoculatie van virus, bleek het ontstaan van het te verwachten cytopathologische effect te verhinderen. Het werd duidelijk, dat de weefselkweek het proefdier kon vervangen voor het aantonen van antilichamen en anderszijds voor de serologische identificatie van de virussen zelf.

Een tweede factor, die bijgedragen heeft tot het tegenwoordig belang van de weefselkweek, was de ontwikkeling van de antibiotica. Toevoeging aan het medium van antibiotica, die voor de cellen noch voor het virus schadelijk zijn, heeft het manipuleren met weefsels en cellen aanzienlijk vergemakkelijkt.

Voor de opkomst der antibiotica waren bacteriële infecties, niet-tegenstaande de strengste asepsis in acht werd genomen, te frequent om de methode der weefselkweek een grote plaats toe te kennen op het virologisch laboratorium. Na toevoeging van antibiotica aan het medium der weefselcultures bleek zelfs directe isolatie mogelijk van virus uit faeces, keelspoelsel en ander sterk bacterieel geïnfecteerd materiaal.

Tenslotte werd nog de techniek van de weefselkweek zeer vereen-

voudigd door de door DULBECCO en VOGT ingevoerde methode, waarbij uitgaande van getrypsineerde cellen, monocellulaire lagen werden verkregen.

Door deze ontwikkeling heeft de weefselkweektechniek het gebruik van levende proefdieren en kippenembryos in vele gevallen kunnen vervangen.

HOOFDSTUK II

DE TECHNIEK VAN HET KWEKEN VAN LENSEPITHEEL IN WEEFSELCULTURES

Bij de onderzoeken werd gebruik gemaakt van technieken die in virologische laboratoria algemeen gangbaar zijn. De door ons toegepaste methodes en enkele wijzigingen die door ons werden aangebracht, zullen worden besproken.

M a t e r i a a l.

Ons materiaal bestond vnl. uit kalfslenzen. De ogen werden direct na de dood van het dier verwijderd en van het slachthuis naar het laboratorium getransporteerd. Dit transport mag hoogstens 10 minuten duren. Voor het prepareren van de lens werd de door VAN DEN HEUVEL (1956) beschreven methode toegepast. Het oog wordt uitwendig zorgvuldig geïodeerd met een wattestaafje. De cornea wordt na een lange incisie langs de limbus, die eventueel met de schaar wordt voltooid, verwijderd. Na een radicale incisie van de iris tot in de iriswortel kan deze gemakkelijk geheel worden losgescheurd. De dan à vue komende zonula wordt geheel van de lens losgeknipt, waarna de lens met het gedeeltelijk daaraan vastzittende glasvocht wordt verwijderd. Een preparaat van kapsel met epitheel wordt eenvoudig verkregen door de kapsel te incideren en deze van het stroma los te trekken. Met deze techniek blijft meestal vrijwel het gehele epitheel aan de kapsel vastzitten. Zijn de ogen niet voldoende vers, doordat het transport vertraging ondervond, of is de temperatuur te veel onder de 35° C gedaald, dan blijkt de verbinding kapsel-epitheel veel losser.

Van het vliesje bestaande uit lensepitheel en kapsel worden \pm 2 mm kleine stukjes geknipt. Deze stukjes worden dan in de cultuurvaten met medium gedeponceerd, waarna deze in de broedstoof bij 37° C worden geplaatst.

M e t h o d e.

Voor het kweken van epitheel uit deze verse ogen gebruikten wij vrijwel steeds kweekvloeistoffen van constante samenstelling.

De samenstelling van onze media wordt hieronder opgegeven. De hoeveelheden van de verschillende componenten zijn steeds berekend op 100 ml compleet medium.

Compleet medium bevat:

- 5 ml geïnactiveerd kalfsserum,
- 75 ml Hanks' oplossing,
- 20 ml van een 2,5% lactalbumine-hydrolysaat oplossing
(eindconcentratie 0,5%),
- 0,25 ml penicilline (eindconcentratie 50 E per ml),
- 0,10 ml streptomycine (eindconcentratie 50 μ per ml).

De complete media worden op dezelfde dag bereid als waarop ze worden gebruikt. De pH van de kweekvloeistof ligt tussen 7,4 en 7,6. Om de vloeistof op de gewenste pH te brengen worden per 100 ml medium 24 druppels 1,4% NaHCO_3 en 6 druppels 0,1 N KOH toegevoegd. Voor de controle van de zuurgraad maken wij gebruik van phenolrood als indicator; phenolrood wordt bij de bereiding van Hanks' oplossing hieraan toegevoegd. De toetsing van de pH geschiedt door vergelijking van de kleur van het medium met die van een pH-contrôlereeks met phenolrood als indicator, welke reeks loopt van pH 6,4 tot 8,2.

Het toevoegen van antibiotica blijkt voor de cellen niet schadelijk te zijn (VERSTEEG). Toevoeging maakt het experimenteren met weefselkweken zeer veel gemakkelijker. Zonder deze toevoeging zou het moeilijker zijn, zelfs bij strenge asepsis, bacteriële infecties van de gekweekte cellen te voorkomen, vooral omdat de techniek van het kweken toch al vrij ingewikkeld is en nogal wat manipulaties vereist.

Wij gebruiken voor het kweken van lensepitheel meestal flessen van Kimble-neutraglas, met een inhoud van 200 ml. In deze flessen pipetteren wij 10 ml van het boven beschreven medium, waaraan dan een stukje lenskapsel met epitheel wordt toegevoegd.

De flessen worden, na van datum en merkteken voorzien te zijn, stationair bij 37° C in de broedstoof geïncubeerd. Na twee tot drie weken is op de wand van het glas een aaneengesloten monocellulaire laag gevormd, wanneer wij uitgaan van het verse orgaan.

Zodra deze cellaag zich heeft gevormd wordt deze voortgekweekt. Op deze wijze wordt een z.g. continue celstam verkregen.

De methode, waarbij door middel van getrypsineerde cellen monocellulaire lagen worden verkregen, is afkomstig van DULBECCO en VOGT. De cellaag, die zich op de glaswand heeft gevormd, wordt tijdelijk beroofd van zijn voedingsmedium, door dit af te schenken en te vervangen door $\frac{1}{4}\%$ trypsine-oplossing, waarna de fles gedurende twintig minuten bij 37°C in de broedstoof wordt geplaatst. De cellen laten dan los van de wand en van elkaar, vooral wanneer de flas tussentijds enige keren voorzichtig wordt bewogen. Door de inwerking van trypsine ontstaat zodoende een suspensie van losse cellen.

Lensepitheelcellen zijn bijzonder resistent tegen inwerking van trypsine. Na incubatie gedurende vijf uur bij 37°C in $\frac{1}{2}\%$ trypsine, zagen wij geen morfologische veranderingen.

Met een Pasteurse-pipet worden dan de cellen verder gesuspenderd. Vervolgens worden dan de cellen met de trypsine-oplossing met behulp van een Pasteurse-pipet uit de fles in een centrifugebuis gebracht. De fles wordt nagespoeld met $\pm 2\text{ ml}$ medium; deze worden eveneens in de centrifugebuis gepipetteerd. Na sluiting van de buis met een steriele gummicapsule wordt deze in de centrifuge geplaatst en drie tot vier minuten op 1000 toeren afgedraaid. De bovenstaande vloeistof wordt daarna afgegoten, waarna het sediment met $0,5\text{ ml}$ medium door middel van een Pasteurs-epipet wordt geresuspendeerd. De suspensie wordt dan verdeeld over twee of drie flessen, waarin van te voren reeds 10 ml medium is gebracht. Door deze „omzetting” van de oorspronkelijke kweek verkrijgen wij zodoende twee of drie nieuwe cultures. Deze nieuwe cultures hebben een veel grotere glasoppervlakte dan de oorspronkelijke cultuur en groeien zeer spoedig als een mooie monocellulaire laag.

Zoals uit voorgaande beschrijving blijkt, gelukt het op twee manieren monocellulaire lagen te krijgen, nl.:

1. uitgaande van het verse orgaan,
2. uitgaande van in het laboratorium continue gekweekte cellijnen.

Onder het microscoop volgens WALDMANN worden de flessen geregeld gecontroleerd.

Om de afkomst van een bepaalde weefselcultuur eenvoudig te kunnen nagaan wordt deze, uitgaande van de primaire cultuur van het verse orgaan, door middel van een systematische notatie, zoals die in ons laboratorium gebruikelijk is, gemerkt.

Bijvoorbeeld:

de primaire cultuur wordt gemerkt als A. Hieruit wordt via een omzetting verkregen:

| | | | |
|------|-----|-----|-----|
| A | | | |
| Aa | | Ab | |
| Aaa | Aab | Aba | Abb |
| enz. | | | |

Tevens wordt steeds mede de datum van omzetting op de fles genoteerd. Notatie en dagtekening worden tegelijkertijd in het kaart-systeem ingeschreven.

Uit deze notatie is dus direct op te maken:

1. van welke primaire cultuur het lensepitheel afkomstig is.
2. hoe vaak er is omgezet voor de betreffende cultuur tot stand kwam.
3. de leeftijd van de betreffende cellijn.

De duur van de periode tussen twee omzettingen wordt mede bepaald door de snelheid waarmede de monocellulaire laag zich ontwikkeld.

Daar ons onderzoek zich voornamelijk bezighield met de beoordeling van het gekleurde preparaat van de lensepitheelcellen, wordt hier niet nader ingegaan op de morphologie van het natieve preparaat, zoals door het microscoop volgens WALDMANN uitstekend is te bestuderen.

HOOFDSTUK III

DE TECHNIEK VAN HET GEKLEURDE PREPARAAT VAN HET LENSEPITHEEL IN DE WEEFSELKWEK

Bij deze studie werd gebruik gemaakt van het gekleurde preparaat van de lensepitheelcellen:

- a. in normaal groeiende cultures,
- b. nadat deze geënt waren met verschillende virussen.

Techniek

Er zijn verschillende methoden om gekleurde preparaten van cellen in weefselcultures te verkrijgen.

1. De directe methode.

Hiervoor laat men cellen op glasstripjes groeien in het weefselkweekvat. De glasstripjes die wij hiervoor gebruiken, zijn rechthoekige plaatjes van 24 bij 10 mm en een dikte van 0,3 mm. Deze stripjes zijn aan een uiteinde voorzien van twee opgesmolten puntjes van araldiet, elk van een diameter van 2,5 mm. Wij zorgen ervoor, dat de glasstripjes zo in de fles worden gelegd, dat ze met de pootjes rusten op de bodem van de fles. Op deze manier gelukt het later gemakkelijk de stripjes weer uit de fles te verwijderen. Dit doen wij met behulp van een lange, slanke pincet, waarmee wij de korte kant van het stripje kunnen pakken.

De glasstripjes worden in de cultuurfles gelegd, tegelijk met het omzetten van een weefselcultuur.

Op deze glasstripjes is reeds na twee tot drie dagen groei van een monocellulaire laag zichtbaar. Dit is gemakkelijk in het natieve preparaat te controleren onder het microscoop. Wanneer het glasstripje voldoende is begroeid, wordt het voorzichtig met het pincet uit de fles gepakt. Het kan vervolgens gekleurd worden.

Alle preparaten voor de in dit proefschrift vermelde waarnemingen zijn volgens deze directe methode gemaakt.

2. De indirecte methode.

Hierbij wordt gebruik gemaakt van de collodium-techniek volgens een door ENDERS en PEEBLES (1954) aangegeven methode. De cellen worden ingebed in collodium en met het collodium uit de buis verwijderd. In plaats van de door ons gebruikte flessen maakt men hier gebruik van cultuurbuizen. De buis wordt uit de broedstoof genomen en onder het microscoop beoordeeld. Daarna wordt de buis leeggegoten en na spoeling met neutrale physiologische zoutoplossing gevuld met methylalcohol om de cellen te fixeren. De fixatieduur bedraagt 15 minuten. De cellen worden dan ingebed in collodium door de buis hiermede te vullen. Gebruik van collodium Merck 6% geeft in het algemeen zeer goede resultaten. De met collodium gevulde buizen sluit men af met een schroefdop met gewone kurk, daar rubberstoppen worden aangetast, en laat ze enige uren liggen. Men gaat dan verder als volgt te werk.

De buizen worden al draaiend leeggegoten en verder voorgedroogd door enige tijd te draaien. Zodra de buis voldoende is voorgedroogd, vult men deze voorzichtig met aqua destillata, waardoor het collodium langs de wand coaguleert. Na 5 minuten ververst men dan het water in de buis. Men ziet nu een opalescerend vlies van de wand loslaten, zodat het gemakkelijk uit de buis is te lichten. Nadat men het collodiumvlies met de cellen uit de buis heeft verwijderd, knipt men het vlies in stukjes en kleurt de cellen die zich hierin bevinden.

VERSTEEG heeft de methode van ENDERS en PEEBLES gemodificeerd, door na fixatie van de cellen met methylalcohol de buis eerst te vullen met haematoxyline. Deze kleurstof laat men 15 tot 60 minuten inwerken, al naar de soort cellen en het gewenste contrast. Daarna giet men de kleurstof terug in de voorraadfles en spoelt de buis gedurende 5 tot 30 minuten in stromend water. Men kan tijdens dit „blauwen” een buis gevuld uit het water nemen, met een kurk afsluiten en zo onder het microscoop beoordelen of het gewenste kleureffect bereikt is. Kleur- en spoeltijd lopen uiteen bij de verschillende celsoorten. Zijn de cellen in de buis tot de gewenste graad gekleurd met haematoxyline, dan neemt men de buizen uit het water en vult ze met alcohol 96%; deze alcohol wordt nogmaals vervangen door alcohol 96%, daarna door absolute alcohol en tenslotte door alcohol-aether.

De alcohol-aether wordt door collodium vervangen. De gemodifi-

ceerde collodium methode heeft het voordeel, dat men weet waar de cellen zich bevinden, voordat men het collodiumvlies in stukjes knipt.

Voor de routine-virologie is deze methode volgens VERSTEEG het meest practisch.

De techniek van het kleuren

Wij zullen thans overgaan tot het beschrijven van de door ons gevolgde kleurtechniek.

Wanneer wij tot de kleuring van een glasstripje overgaan, wordt dit op de boven beschreven wijze voorzichtig uit de fles verwijderd. Daarna wordt het glasstripje eerst even gespoeld met een neutrale physiologische zoutoplossing om zoveel mogelijk alle eiwitten, afkomstig van media en celafbraak te verwijderen. Laat men dit spoelen na, dan zien wij vooral bij gebruik van hoge serumconcentraties in de media hinderlijke eiwit-neerslagen op de cellen in het preparaat; details komen daardoor minder goed tot hun recht. Vervolgens worden de cellen op het glasstripje gefixeerd. Hiertoe zetten wij de stripjes in speciaal daarvoor geconstrueerde glazen rekjes en plaatsen deze in de fixatievloeistof.

Wij hebben bij onze onderzoeken steeds gebruik gemaakt van de fixatievloeistof van CARNOY, die bestaat uit de volgende samenstelling:

| | |
|------------------|----|
| alcohol absoluut | 60 |
| chloroform | 30 |
| ijsazijn | 10 |

Onze fixatieduur bedraagt 2 minuten.

Na de fixatie wordt het preparaat overgebracht in absolute alcohol; daarna door de alcoholreeks gevoerd tot in gedestilleerd water. Daarna kan tot kleuring worden overgegaan. Hiertoe werden voor dit onderzoek verschillende kleuringen getest en vergelijkenderwijs beoordeeld.

M e t h o d e n.

De mooiste resultaten bereikten wij met de ijzerhaematoxyline kleuring volgens HEIDENHAIN. Deze werd door ons aldus uitgevoerd:

er wordt een uur gebeitst met 2,5% ijzeraluin. Na spoeling met aqua destillata volgt dan de kleuring met Heidenhain's haematoxyline gedurende \pm 10 minuten. Het bereiken van het juiste kleureffect wordt beoordeeld door dit van tijd tot tijd even onder het microscoop te controleren en eventueel de kleuring te onderbreken door met aqua

destillata te spoelen. Is de kleuring te sterk geworden, dan kan men met ijzeraluin differentiëren. Is de haematoxyline-oplossing te vers, dan blijken de preparaten te licht van kleur te blijven. De haematoxyline-stamoplossing moet vier tot vijf weken aan de lucht rijpen. Voor gebruik werd de stamoplossing verdund met de zelfde hoeveelheid aqua destillata.

Is het gewenste kleureffect bereikt, dan wordt 30 minuten gespoeld in stromend water, waarna de eindkleuring met eosine gedurende 8 minuten plaats heeft. Het preparaat wordt watervrij gemaakt door doorvoering door de alcoholreeks tot in xylol. De preparaten worden daarna opgebracht in canada-balsem.

Goede resultaten verkregen wij ook met de haematoxyline-eosine kleuring volgens MAYER (ROMEIS). Om voldoende kleuring van het lensepitheel te verkrijgen, waren de normale kleurtijden niet gunstig; er moet zeer lang met Mayer's haematoxyline, nl. 16 tot 18 uur gekleurd worden. Kleuring met eosine gedurende 8 minuten is voldoende.

Minder goede resultaten gaf bij ons de methylgroen-pyronine kleuring volgens BRACHET (PEARSE) of volgens UNNA (ROMEIS). Zelfs met een langdurige kleuring met methylgroen-pyronine van bv. 16 tot 24 uur was het kleureffect zo gering, dat de beoordeling van details tegenviel.

Proefnemingen met de May-Grünwald-Giemsa kleuring volgens de techniek van PAPPENHEIM (ROMEIS) gaf een redelijk beeld, dat echter in geen geval te vergelijken viel met de fraaie resultaten die geboekt werden met de haematoxyline kleuringen.

Wij hebben ons dan ook na deze proefnemingen met verschillende kleurtechnieken vooral bepaald tot de kleuring volgens HEIDENHAIN met ijzerhaematoxyline.

Bij de beoordeling van het gewenste kleureffect hebben wij ons steeds als doel voor ogen gesteld, dat voor onze toekomstige experimenten vooral de kernstructuurveranderingen beoordeeld zouden moeten worden.

HOOFDSTUK IV

DE BEOORDELING VAN LENSEPITHEELCELLEN IN HET GEKLEURDE PREPARAAT VAN NORMAAL GROEIENDE WEEFSELCULTURES

De beoordeling van de morphologie van de lensepitheelcellen in het gekleurde preparaat van normaal groeiende cultures is onmisbaar bij ons onderzoek, ter contrôle van het effect dat optreedt na inoculatie van virussen.

Wij willen deze niet beënte weefselkweken betitelen als normaal.

De contrôle dient op tenminste twee tijdstippen te geschieden.

En wel:

- a. voordat de beënting met virusmateriaal plaats vindt; hiertoe wordt een gekleurd preparaat gemaakt, afkomstig van dezelfde stam, dat als contrôle wordt gebruikt.
- b. worden er na afloop gekleurde preparaten gemaakt van bij iedere proef parallel meelopende, niet beënte contrôle cultures.

Bij de beoordeling van het gekleurde preparaat van normaal groeiende cultures letten wij op de volgende punten:

1. de morphologie van de kern
 - a. het kernvolume
 - b. de kernwand
 - c. de nucleoli
 - d. de chromatinestructuur
 - e. de kernkleurbaarheid
 - f. de mitosen
2. de morphologie van het celplasma
 - a. het celvolume
 - b. de begrenzing van het protoplasma
 - c. de vorm van de cellen
 - d. de structuur van het protoplasma
 - e. de kleurbaarheid van het protoplasma

Wij zullen thans een beschouwing wijden aan de morfologie van lensepitheelcellen, zoals wij die in normaal groeiende weefselcultures aantreffen. Wij doen dit aan de hand van enige microphoto's van normaal lensepitheel.

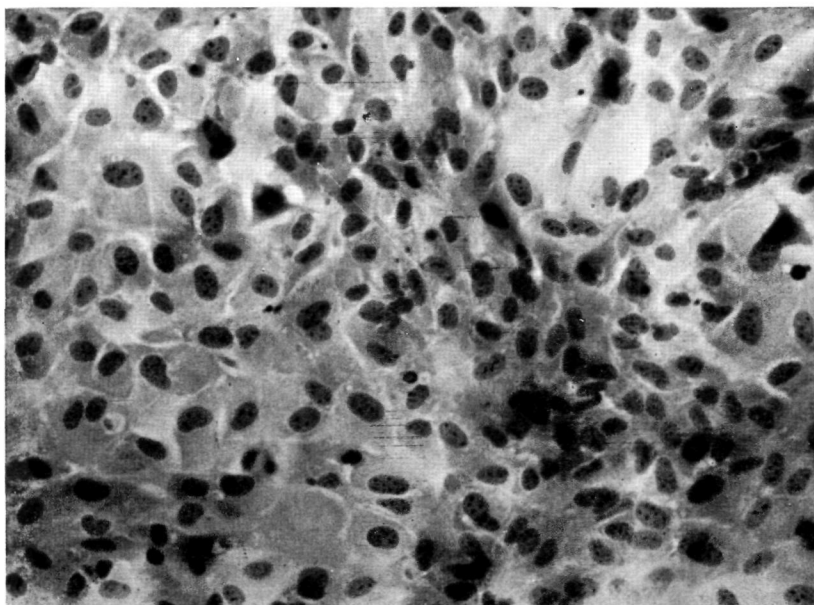


Fig. 1. Normaal lensepitheel (200 x).
Kleuring met haematoxyline-eosine.
In medium met 30% KS.

DE MORPHOLOGIE VAN DE KERN

Het volume van de kernen is ongeveer gelijk. Er is een geringe onregelmatigheid in de vorm, de meeste zijn ovaal, sommige wat langer en smaller.

Bij meting met behulp van een meetoculair, van 500 kernen, bleek de lengte $17,1 \pm 0,6 \mu$ te bedragen.

De kernmembraan is glad en vertoont geen onregelmatigheden.

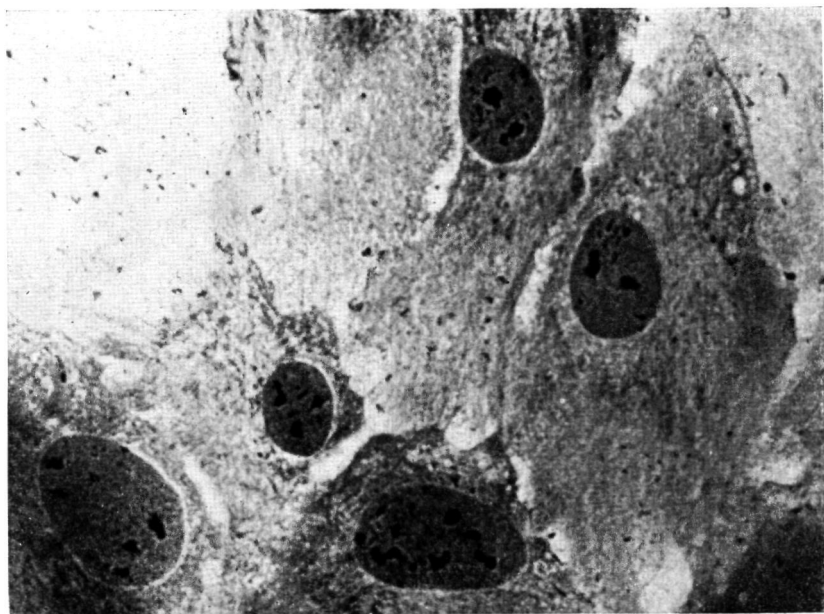


Fig. 2. Normaal lensepitheel (650 x).
 Kleuring met Heidenhain's haematoxyline en eosine.
 In medium met 30% serum.

In de kernen zien wij een verschillend aantal verdichtingen, variërend van twee tot zeven. Deze verdichtingen zijn meestal rond of ovaal, een enkele maal wat onregelmatig hoekig van vorm. Echte vertakkingen of geweivorming werden niet waargenomen.

De chromatinestructuur in de kernen is verder buitengewoon fijn. Met de beschreven methoden zijn de kernen gelijkmatig kleurbaar. Zowel met de haematoxyline-kleuring volgens MAYER als volgens HEIDENHEIN kregen wij steeds voortreffelijke preparaten.

Door de gehele cellaag verspreid zijn alle stadia van mitosen te vinden.

Insluitsels in de kernen werden in normaal groeiend lensepitheel nooit waargenomen.

DE MORPHOLOGIE VAN HET CELPLASMA

Het celvolume is wisselend, de begrenzing niet overal even duidelijk. De normale vorm van de lensepitheelcellen is onregelmatig poly-

gonaal, de begrenzingen zijn vaak enigszins gebogen. De uitlopers zijn soms vrij plomp en dringen als zodanig tussen andere cellichamen in. Overgaan van een celuitloper in een andere cel wordt nooit gezien.

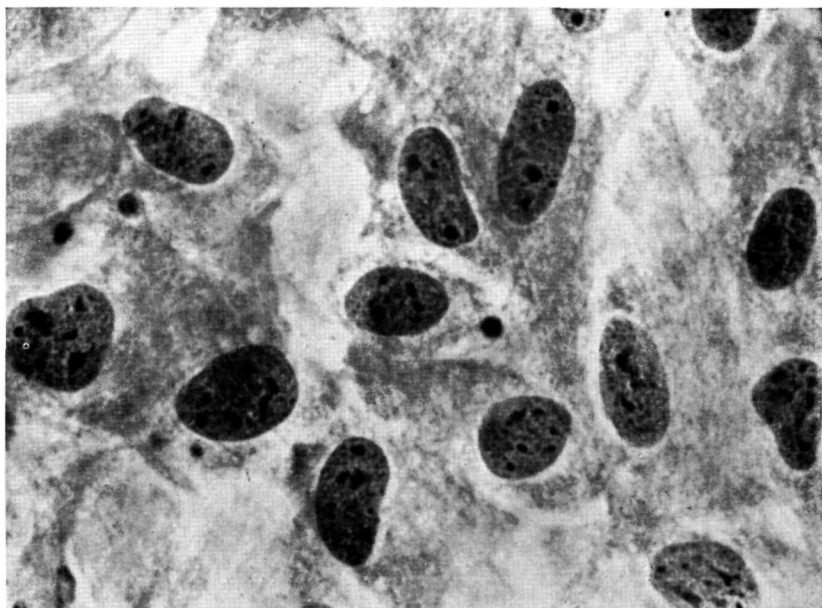


Fig. 3. Normaal lensepitheel (800 x).
Kleuring met haematoxyline-eosine.
In medium met 30% KS.

Syncytium-vorming onderling wordt bij normaal lensepitheel niet waargenomen. De celkleurbaarheid is over het algemeen goed. De grondsubstantie van het plasma lijkt min of meer homogeen; er is een uiterst fijne granulatie waar te nemen. Het voorkomen van wat grovere draadjes en korreling behoort tot het normale beeld.

Insluitlichamen werden in normaal lensepitheel nooit gezien.

AFWIJKINGEN IN DE SAMENSTELLING VAN HET MEDIUM

Bij de beoordeling van lensepitheelcellen in het gekleurde preparaat van normaal groeiende weefselcultures hebben wij verder de invloed van afwijkingen in de samenstelling van het medium nagegaan.

De invloed van de serumconcentratie in het medium

Het normale medium bevat 5 tot 30% kalfsserum. Bij nauwkeurige bestudering van de gekleurde preparaten vielen enkele verschillen op. De vorm van de epitheelcellen wordt bij geringere serumconcentratie (5%) meer langwerpig. De kernen lijken wat langer en smaller te worden, het aantal verdichtingen neemt toe. De kernwand blijft glad en vertoont nergens rimpeling. De celgroei is duidelijk vertraagd; de glaswand is veel minder snel volgegroeid. Mitosen komen minder voor naarmate de serumconcentratie geringer wordt. Het protoplasma lijkt een wat meer netvormige structuur te vertonen bij geringe serumconcentratie. (Fig. 4.)

In media met hogere serumconcentratie groeien de cellen duidelijk rijkelijker. Zij zijn over het algemeen meer polygonaal.

De invloed van overmaat antibiotica

Van toevoeging van drie maal de normale hoeveelheid penicilline en streptomycine zagen wij in het gekleurde preparaat nooit enige afwijking.

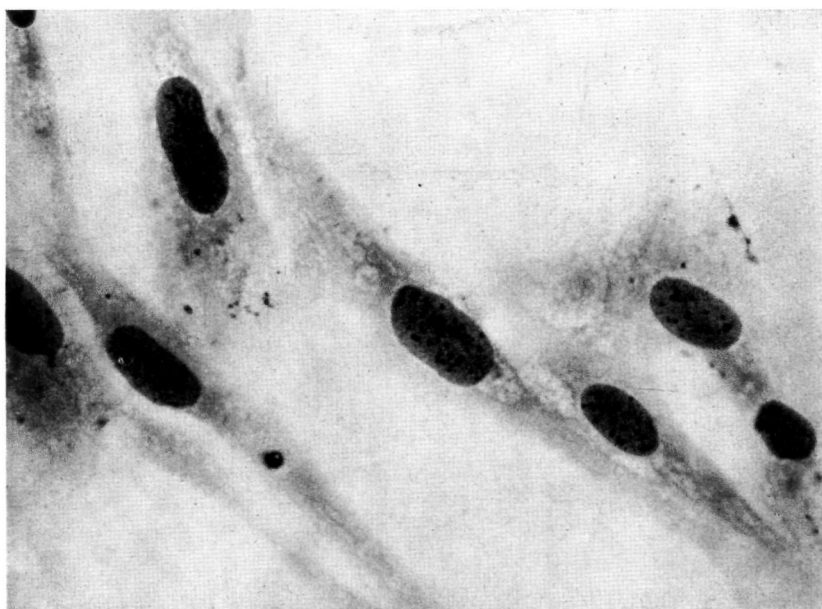


Fig. 4. Normaal lensepitheel (500 x).
Kleuring met haematoxyline-eosine.
In medium met 5% kalfsserum.

Invloed van de zuurgraad op de weefselkweek

De zuurgraad van ons medium werd steeds op een pH van 7,4 tot 7,6 gehouden. Wij hebben dit in hoofdstuk II reeds beschreven. Na enige tijd bebroeden zakt deze pH; dit blijkt dan uit het geel worden van het medium. Wij trachten een zoveel mogelijk constante zuurgraad te verzekeren, door elke drie dagen het medium te verversen.

VERSTEEG beschreef in cellen in het gekleurde preparaat ontmenging van het celplasma, waarbij het lijkt alsof het plasma vol schollen zit, als gevolg van een te hoog alkaligehalte van het medium. Dergelijke veranderingen werden door ons in het gekleurde preparaat van lensepitheel nooit gezien.

Invloed van de hoeveelheid medium op de morphologie van de cellen

Bij het aanleggen en verversen van weefselcultures pipetteren wij steeds 10 ml medium in onze cultuurflessen. Een te dikke laag vloeistof gaat de celgroei tegen. Waarschijnlijk is dan de gaswisseling gestoord.

VERSTEEG zag echter nooit duidelijke celdegeneraties in het gekleurde microscopische preparaat bij proeven die hij nam met te veel medium.

HOOFDSTUK V

HET BEËNTEN VAN LENSEPITHEEL IN WEEFSEL CULTURES MET VERSCHILLENDE VIRUSSEN

Vervolgens werd lensepitheel in weefselcultures beënt met virussen van verschillende grootte.

Wij wilden hiermede in de eerste plaats nagaan of zich na beënting van lensepitheel een cytopathologisch effect zou voordoen. Hieronder verstaan wij morphologische veranderingen in de cellen, ontstaan door de groei van virus in de weefselcultuur. Wij moeten dit onderscheiden van het zogenaamd toxisch effect, waarbij er weliswaar morphologische veranderingen in de cellen zijn, maar geen vermenigvuldiging van virus plaats vindt. Het toxisch effect komt in slechts enkele dagen tot stand, wanneer men een relatief grote dosis virus aan de cellen toevoegt; het cytopathologisch effect tengevolge van virusvermenigvuldiging treedt meestal later op. Het toxisch effect is, in tegenstelling tot het door virus veroorzaakte, niet overentbaar.

De grootte had onze bijzondere belangstelling in verband met de onderzoekingen die wij wilden doen naar de permeabiliteit van de lenskapsel voor virussen.

Kweken en waargenomen cytopathologische effecten van virussen in nierweefsel van apen, muizen, varkens en konijnen, in HeLa-cellen, amnioncellen en vele andere celsoorten werden reeds vroeger door andere onderzoekers beschreven (ROBBINS en ENDERS, LYNN en MORGAN, SANDERS, VERSTEEG). Groei van virussen in lensepitheel met daarmede gepaard gaande cytopathologische veranderingen vonden wij slechts eenmaal in de literatuur vermeld: VAN DER VEEN en HEYEN zagen na enting van adenovirus cytopathologische veranderingen gelijkend op die in HeLa-cellen. Een nadere beschrijving ontbreekt echter, terwijl ook geen gekleurde preparaten werden gemaakt.

Van een aantal verkrijgbare virussen kozen wij enige van verschillende grootte:

Adenovirus type 3 en 7 (diameter $\pm 75 \text{ m}\mu$).

Mazelenvirus (diameter $\pm 25 \text{ m}\mu$).

Poliovirus (diameter $\pm 27 \text{ m}\mu$) en

Vacciniavirus ($210 \times 260 \text{ m}\mu$).

Materiaal in de vorm van adenovirus en poliomyelitis virus werd tot onze beschikking gesteld door Prof. Dr. J. van der Veen, Directeur van de afdeling gezondheidsleer van de R.K. Universiteit te Nijmegen.

Dr. F. Dekking, Conservator van het laboratorium voor de gezondheidsleer van de Amsterdamse Universiteit stelde mazelenvirus tot onze beschikking.

Van Prof. Dr. R. Gispén, Directeur van het Rijks-Instituut te Utrecht ontvingen wij vaccinia virus.

DE ADENOVIRUSSEN

In 1953 isoleerden ROWE, HUEBNER en medewerkers uit adenoid weefsel van een kind een nog onbekend virus. Toevoeging van antibiotica aan het medium had het hun mogelijk gemaakt dit bacterieel verontreinigde weefsel in cultuur te brengen. Na enige weken zagen zij in vele cultures een spontane progressieve degeneratie optreden als gevolg van een vermenigvuldiging van een in dit weefsel latent aanwezig virus.

HILLEMANN en WERNER isoleerden in dezelfde tijd een virus uit keelslijm van lijders aan een met koorts verlopende ziekte van de bovenste luchtwegen.

Het bleek dat men te maken had met verschillende types van een nieuwe groep virussen. Aanvankelijk werden deze virussen A.D. (adenoid-degenerating), R.I. (respiratory illness), A.P.C. (adenoidal-pharyngeal-conjunctival), of A.R.D. (acute respiratory disease)-virussen genoemd, maar in 1956 werd na gezamenlijk overleg de naam adenovirus gekozen.

Sindsdien is men tot 23 verschillende immunologische types van dit virus gekomen. Alle types van de adenovirusgroep hebben een gemeenschappelijk complementbindend antigeen. Dit wordt gevormd tijdens het kweken in weefselcultuur. Voor de diagnostiek van een onbekend virus is dit dus goed bruikbaar.

Anderzijds veroorzaakt de vermenigvuldiging van adenovirussen in cultures van continu voortgekweekte cellen duidelijke morphologische afwijkingen. Dit cytopathologische effect is kenmerkend voor

deze groep virussen en verschilt duidelijk van dat van andere bekende virussen, zoals door BARSKI in 1956 werd vastgesteld.

VERSTEEG bevestigde het optreden van een specifiek cytopathologisch effect na enting van adenovirus op papilloomcellen in weefselcultuur, waardoor microscopische diagnose van een adenovirusinfectie mogelijk is.

Eigen experimenten met adenovirus

M a t e r i a a l.

Wij entten adenovirus van het type 3 en van het type 7 op cultures van lensepitheel.

De prototypestam G.B. van type 3 werd uit neusspoelsel geïsoleerd door de National Institutes of Health, U.S.A.; de prototypestam „Gomen” van type 7 werd geïsoleerd door Berge uit keelspoelsel. Het virologisch laboratorium ontving deze stammen van Dr. R. J. Huebner.

De beënte cultures waren alle afkomstig van onze cellijnen Aaa en Aab, en na vier passages drie maand oud.

De te beënten cultures werden 5 à 6 dagen voordien omgezet, waarbij dan gelijktijdig een glasstripje in de betreffende flessen werd gelegd. Een dag voor beënting werd microscopisch in het natieve beeld gecontroleerd of de glasstripjes voldoende begroeid waren. Met elk type werden telkens tien flessen beënt. Daarnaast werden van dezelfde cellijn gelijktijdig controleflessen aangehouden. Na beënting werden de flessen weer in de broedstoof geplaatst bij 37° C.

Daar het bekend is dat bij een te groot inoculum een snel optredend niet specifiek cytopathologisch effect, dat afwijkend is van het door het virus veroorzaakte beeld, kan voorkomen, werden de inocula in verdunningen uitgezet om de invloed van de toxische factor te verminderen. Gebruikt werden verdunningen 10^{-2} , 10^{-3} en 10^{-4} van het uitgangsmateriaal.

Na 1x, 2x tot en met 10x 24 uur werd telkens een glasstripje uit een fles gehaald, gefixeerd en gekleurd en vergeleken met het gekleurde controle-preparaat van niet-beënt lensepitheel.

De groei van adenovirus in lensepitheel blijkt al spoedig uit het veel sterker zuur worden van het medium, vergeleken met dat in de niet geïnfecteerde controleflessen. Het resultaat van de adenovirusinfectie is een versterkte synthese van desoxyribonucleïnezuur, ver-

meerderd glucoseverbruik en vermeerderde ophoping van melkzuur, afkomstig van de koolhydraatstofwisseling (FISHER en GINSBERG).

De versterkte glycolysis en productie van zuren door de geïnfecteerde cellen doen de zuurgraad van het medium van deze cultures aanzienlijk toenemen vergeleken met niet geïnfecteerde cultures.

Bij onze proeven kwam dit ook duidelijk tot uiting.

Het cytopathologische effect

De veranderingen betreffen voornamelijk de kernen van de geïnfecteerde lensepitheelcellen. Het cytoplasma vertoont in het algemeen veel minder typische veranderingen.

De kernlaesies.

De veranderingen teweeg gebracht door de door ons gebruikte types 3 en 7 waren vrijwel identiek. De vroegste veranderingen zagen wij 24 uur na de inoculatie. Deze bestaan uit een veranderde chromatineverdeling in een kant- of netwerkformatie met grove verdichtingen. De chromatineverdichtingen nemen vaak eigenaardige herten-geweiachtige vormen aan. Hieromheen zien wij vaak ophelderingen of lichte randen. (Fig. 5 en 6).

Na 3 x en 4 x 24 uur zien wij de kernen groter worden en van vorm veranderen. Peripheer in de kern ontstaat vacuolevorming, die zich uitbreidt tot een vaak heldere periphere zône. In het centrum van de kern ontstaat een basophiele ronde massa, die in het begin niet geheel homogeen lijkt.

Het meest typische beeld zien wij na 7 x of 8 x 24 uur. De kernen zijn sterk in grootte toegenomen. De kernwand blijft intact en goed waarneembaar. In het midden van de kern ligt een groot, dicht, basophil insluitlichaam, hier en daar door dunne strengetjes verbonden aan de kernwand. Tussen de kernwand, strengetjes en insluitlichaam zien wij ruimten die men vacuolair zou kunnen noemen.

Wij zien soms een honingraatachtig beeld; andere malen treft ons een rosetachtig aspect. Op de plaatsen waar de strengen van het insluitlichaam naar de kernwand lopen, lijkt deze soms ingetrokken, waardoor een gelobd aspect van de kern ontstaat. Soms wordt de kernomtrek geheel misvormd.

Uiteindelijk neemt de centrale massa de gehele kern in en wordt sterk basophil en pycnotisch.

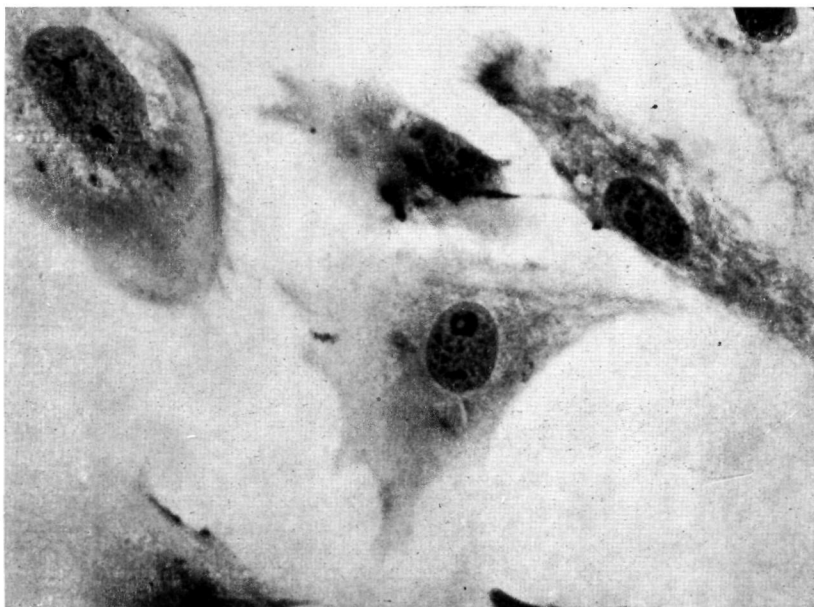


Fig. 5. Cytopathologisch effect
adenovirus type 3, na 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.

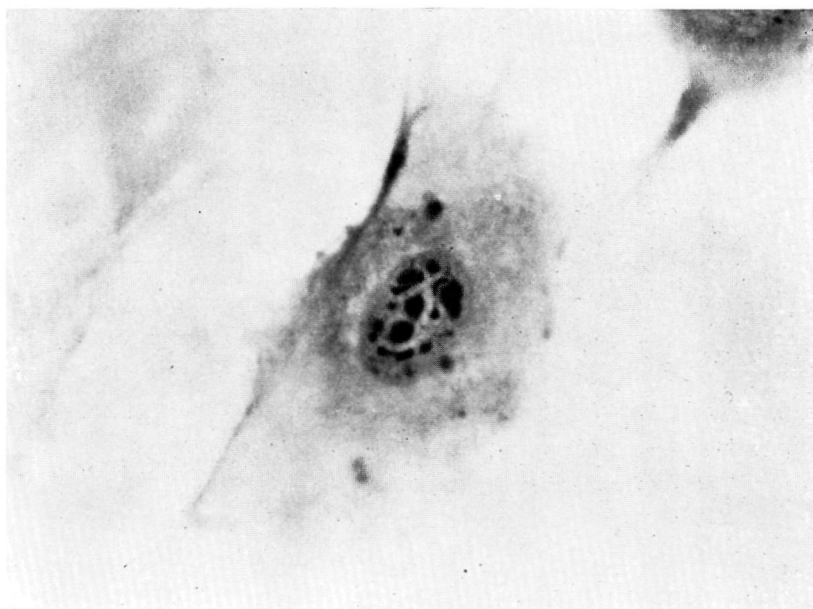


Fig. 6. Cytopathologisch effect
adenovirus type 7, na 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.

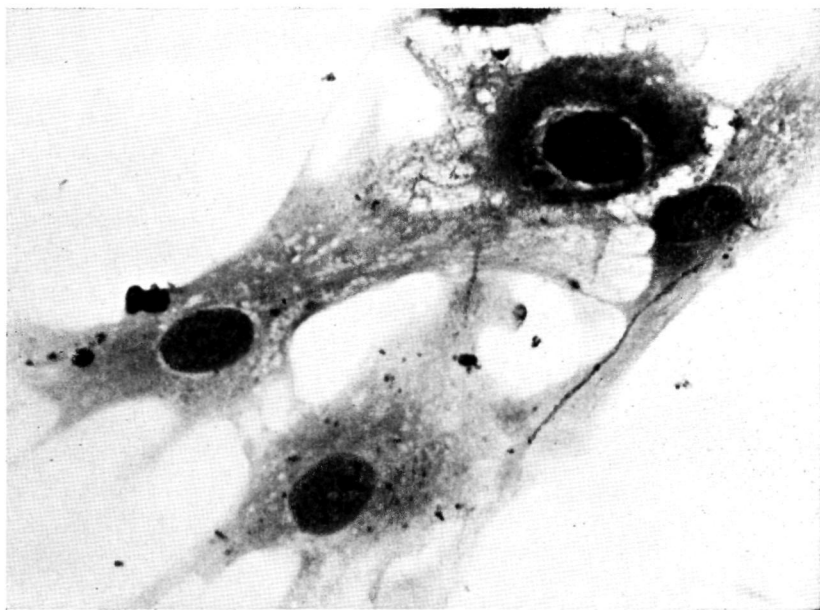


Fig. 7. Cytopathologisch effect
adenovirus type 7, na 3 x 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.



Fig. 8. Cytopathologisch effect
adenovirus type 7, na 7 x 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.

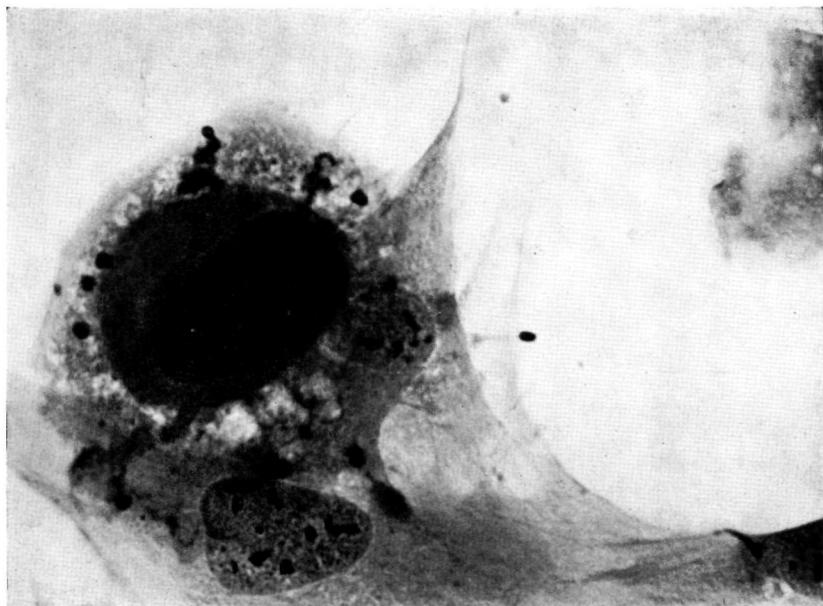


Fig. 9. Cytopathologisch effect
adenovirus type 7, na 7 x 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.



Fig. 10. Cytopathologisch effect
adenovirus type 7, na 7 x 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.

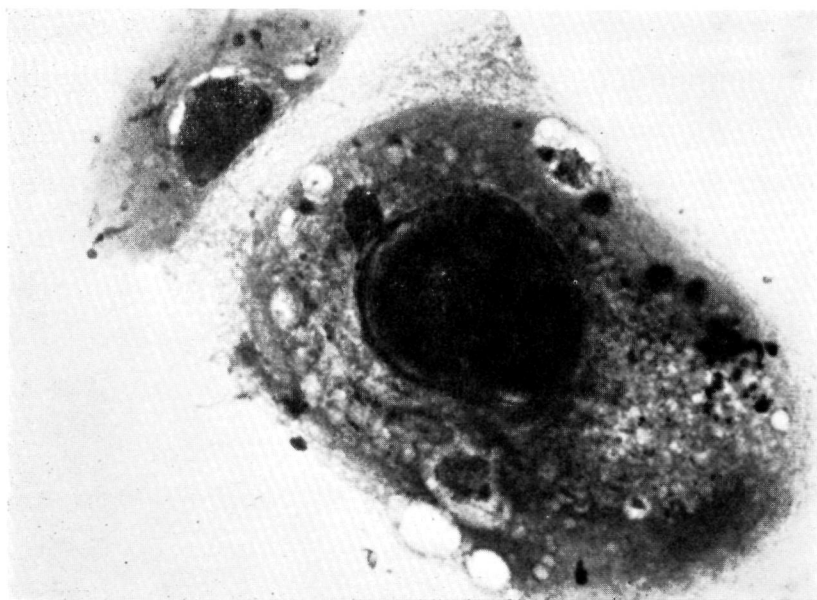


Fig. 11. Cytopathologisch effect
adenovirus type 7, na 7 x 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.

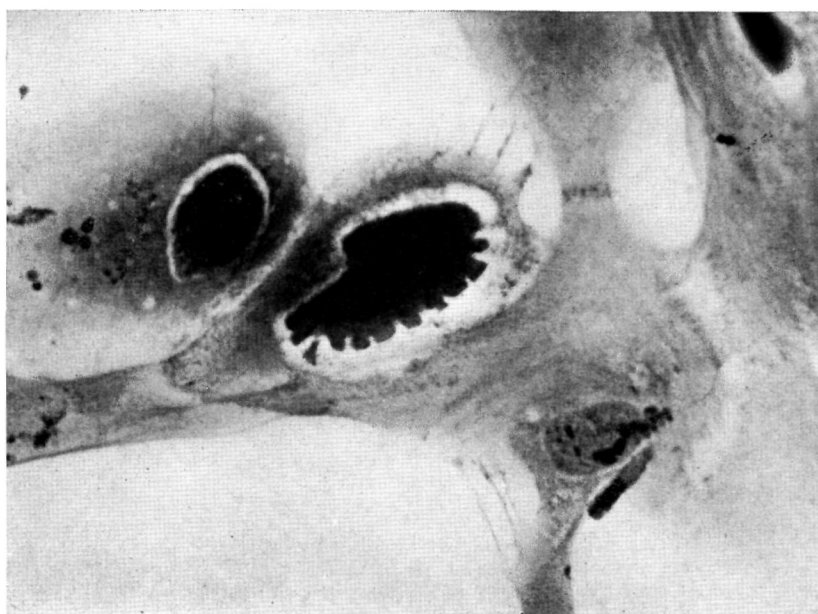


Fig. 12. Cytopathologisch effect
adenovirus type 7, na 7 x 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.

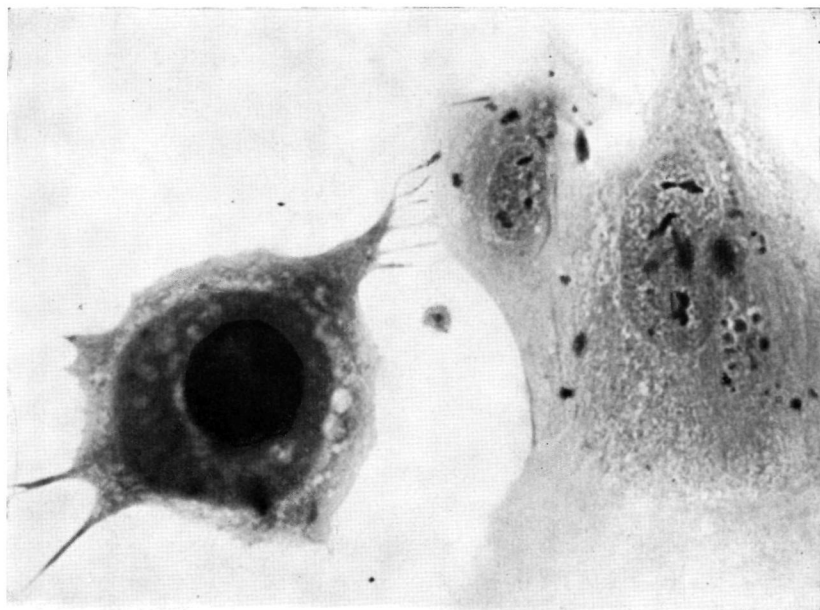


Fig. 13. Cytopathologisch effect
adenovirus type 7, na 7 x 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.

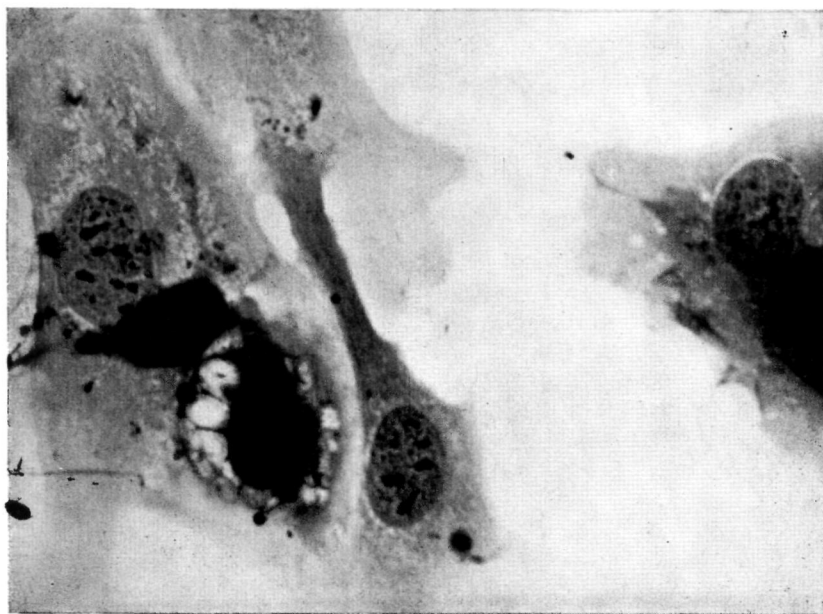


Fig. 14. Cytopathologisch effect
adenovirus type 7, na 8 x 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.



Fig. 15. Cytopathologisch effect
adenovirus type 7, na 8 x 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.
Er is duidelijk een centrale basophile massa te zien,
die de gehele kern inneemt.

Zie fig. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 en 15.

In figuur 8 en 9 valt de sterke volumetoename van de kern direct op. In het centrum is de basophile, homogene massa duidelijk zichtbaar. De periphäre vacuolaire zône is vooral op fig. 8 goed te zien.

De cytoplasmalaesies.

Het begin is een volumetoename van het cytoplasma. Dit wordt meer eosinofiel. Er vormen zich zeer vele kleine vacuolen. Daarna treedt er retractie op van het cytoplasma en wordt de continuïteit van de homogene cellaag verbroken.

Deze cytoplasmaveranderingen zijn niet kenmerkend voor adenovirusinfecties.

Verschil in cytopathologisch effect tussen adenovirus type 3 en type 7, hebben wij niet waargenomen. Dit komt overeen met de waarnemingen van BARSKI en CORNEFERT (1958), die mededelen geen verschil in cytopathologische veranderingen te hebben gevonden tussen type 3, 4 en 7. Zij vonden ook dat de types 1, 2 en 5 een identiek

cytopathologisch effect veroorzaken, dat volgens hun waarnemingen een verschil te zien geeft met dat van de types 3, 4 en 7. Type 1, 2 en 5 zouden een sterkere vacuolisering en meer polymorph insluitlichaam veroorzaken. Bij type 3, 4 en 7 zou het insluitel compacter zijn, centraal gelegen en omgeven door een halo. De kernvacuolisering treedt wel op, maar in geringere mate en meer peripheer.

VERSTEEG (1959) heeft dit verschil echter niet kunnen bevestigen.

POLIOVIRUS

Na onze experimenten met de adenovirussen leek het ons belangwekkend deze met poliovirus te herhalen.

ENDERS (1949) beschreef als eerste de gevoeligheid van celcultures van menselijke embryonale weefsels voor poliovirus. Later bleken ook cultures van apenniercellen, HeLa-cellen en papilloomcellen gevoelig. SHEFFIELD en CHURCHER beschreven groei van poliovirus op cultures van konijnennier. DUNHAM en EWING zagen groei van alle drie prototypen van poliovirus op cultures van de chorionallantoïsmembraan van kippenembryos. VAN DER VEEN en HEYEN zagen geen cytopathologisch effect in gecultiveerd kalfslensepitheel na inoculatie van poliovirus. Groei van poliovirus op cellen van bovine herkomst vonden wij nergens vermeld.

Eigen experimenten

Materiaal en Methode.

Op lensepitheelcultures werd poliovirus type 1 geënt.

De cultures waren alle vier maanden oud, van twee verschillende cellijnen afkomstig en verkregen na 5 passages: A'ababb, A'bbbbba en D'aabab. De prototypestam van type 1 (Mahoney) ontving het virologisch laboratorium van het communicable disease center USA. Van het uitgangsmateriaal maakten wij verdunningen van 10^{-3} en beënten hiermede onze cultures. Als contrôle dienden cultures afkomstig van dezelfde cellijnen, alle eveneens vier maanden oud en verkregen na 5 passages: A'ababa, A'bbbbbb en D'aabaa.

R e s u l t a t e n.

Reeds na een dag blijkt er een aanzienlijke destructie op te treden. De cellaag is op sommige plaatsen reeds geheel verdwenen; elders treedt een duidelijke cytoplasmaretractie op, de cellen ronden zich af.

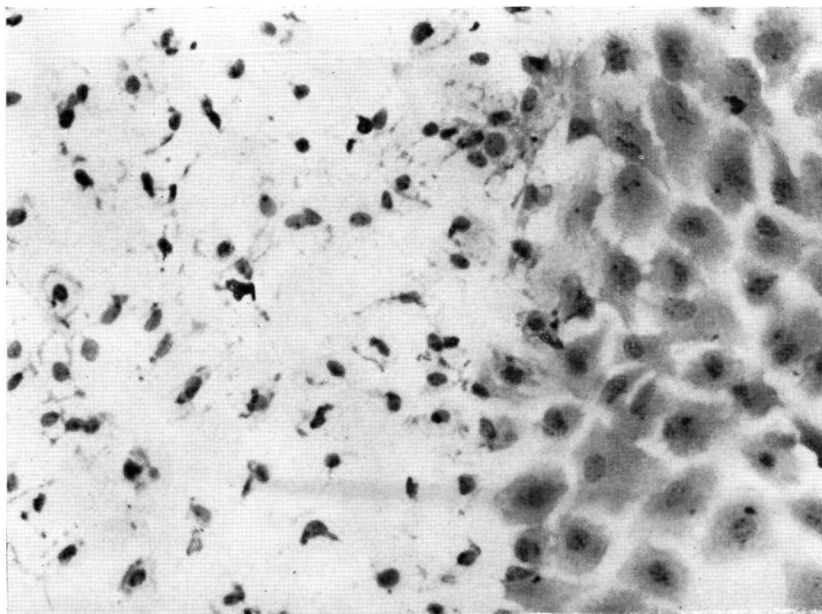


Fig. 16. Cytopathologisch effect
van poliovirus type 1, na 2 x 24 uur (200 x). Kleuring H.H.E.

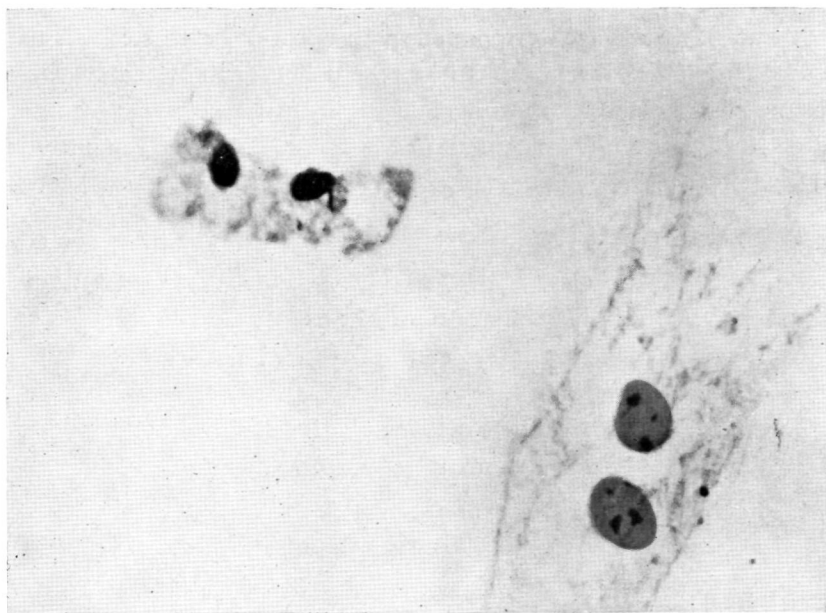


Fig. 17. Cytopathologisch effect
van poliovirus type 1, na 2 x 24 uur (650 x). Kleuring H.H.E.

De kernen worden kleiner, platten zich af en worden op den duur geheel pycnotisch. In het protoplasma zien wij het verschijnen van vacuolen en korreling.

Na twee dagen zijn er maar weinig normale cellen te zien. De kern ligt dan als een pycnotische rest tegen de wand van de sterk in volume afgenomen cel aan, het protoplasma is geheel gevacuoliseerd.

Na drie dagen is de degeneratie totaal; er is vrijwel geen enkele normale cel meer te zien.

Na onze eerste reeks experimenten met poliovirus type 1 werden deze voor een tweede maal uitgevoerd, nu echter met lensepitheel afkomstig van een drie maanden oude cellijn.

Uitgegaan werd van een cultuur Pabb, die na drie passages ontstaan was uit de primaire kweek P. Van het uitgangsmateriaal, dat weer bestond uit de prototypestam van type 1 (MAHONEY), maakten wij verdunningen van 10^{-4} en beënten hiermede onze cultures. Na twee dagen was cytopathologisch effect waar te nemen, dat de derde en vierde dag nog toenam. Het medium met de zich daarin bevindende cellen werd gecentrifugeerd; de bovenstaande vloeistof werd afgepipetteerd. Deze geoogste vloeistof werd opnieuw geënt op lensepitheelcultures, nadat wij deze ook tot 10^{-4} hadden verdund. Wederom trad na twee dagen cytopathologisch effect op, even sterk als na eerste enting. Ook van deze cultures werd het medium geoogst, opnieuw verdund tot 10^{-4} en nogmaals op lensepitheel geënt. Ook na deze passage zagen wij cytopathologisch effect, nu echter pas na vier dagen en in geringere mate dan na vierde enting.

Conclusie

Gecultiveerd kalfslensepitheel blijkt gevoelig te zijn voor poliovirus type 1. Uit de overentbaarheid van het cytopathologisch effect blijkt dat hier geen sprake kan zijn van een toxisch effect, maar dat vermenigvuldiging van virus moet hebben plaats gehad.

MAZELENVIRUS

ENDERS, PEEBLES, MCCARTHY en MILOVANOVIC gaven in 1957 een uitstekend overzicht over de experimenten met mazelenvirus.

Nadat in 1911 GOLDBERGER en ANDERSON voor het eerst de gevoeligheid voor mazeleninfectie voor de *Macacus Rhesus* Aap konden

aantonen, gelukte het pas in 1930 voor het eerst mazelenvirus te kweken op weefselcultures afkomstig van kippenembryo's (PLOTZ).

Dit laatste werd bevestigd door RAKE en SHAFFER. In 1954 slagen ENDERS en PEEBLES erin virus uit bloed en keelspoelsel van een mazelenpatiënt te kweken op een weefselcultuur van menselijke nieren.

In dit menselijke nierweefsel beschrijven zij dan het voor mazelenvirus typische cytopathologische effect, nl.: 1. syncytiumvorming; 2. het verschijnen van multinucleaire reuscellen; 3. de aanwezigheid van eosinophile insluitsels in de meeste kernen; 4. voorkomen van onregelmatige massa's eosinofiel materiaal in het cytoplasma.

Werd het virus overgeënt op bepaalde andere cellen, dan trad daarin hetzelfde cytopathologische effect op, gedurende een beperkt aantal passages. Ook HeLa-cellen bleken voor mazelenvirus gevoelig te zijn. In bovine cellen kon men echter geen cytopathologische veranderingen aantonen.

ENDERS vond dat na langdurig kweken in vitro de cytopathologische eigenschappen van het virus veranderen. Naast de multinucleaire reuscellen verschijnen in toenemend aantal fusiforme en stervormige cellen, die enigszins op fibroblasten gelijken. In latere cultures blijkt dit soms het enige cytopathologische effect te zijn. In deze cellen worden vaak eosinophile insluitsels gevonden in het gekleurde preparaat.

In 1957 werden door WARREN en CUTCHINS cultures van het bovine long-, spier- en nierweefsel getest op hun gevoeligheid voor een groot aantal virussen. Gebruikt werden een Eagle-medium met 2 tot 20% kalfsserum. Aan 1 ml vers medium werd 0,1 ml virussuspensie toegevoegd. De cultures werden beënt na 11 tot 30 passages. Bij hun proeven met bovine weefsels vonden zij deze gevoelig voor vaccinia-virus, herpesvirus, adenovirus type 2, 3, 4 en 7. Andere virussen gaven geen cytopathologisch effect. Een negatief resultaat kregen zij o.a. met poliovirus type 1 en 3, bofvirus, mazelenvirus en influenza A en B virus. Indien cytopathologische effecten optraden waren deze dezelfde als na groei in cultures van apen- en mensenweefsel.

In 1959 gelukt het toch eindelijk SCHWARZ en ZIRBEL mazelenvirus te kweken in bovine cellen. Zij maakten hierbij gebruik van de Edmonston-strain van Enders, aangepast aan nierweefsel van de mens en menselijk amnionweefsel. Gebruikt werden bovine nierweefselcultures in medium vlg. Earle met 5% kalfsserum. Na 70 dagen trad

er een cytopathologisch effect op. Werden deze cultures geoogst, dan trad na passage het effect sneller op (na 24 dagen). Het cytopathologisch effect bestond uit syncytiumachtige formaties, veelkernige reuscellen, eosinophile kerninsluitels en eosinofiel amorph materiaal in het cytoplasma.

Wij kunnen hieruit dus concluderen, dat voor het verkrijgen van een typisch cytopathologisch effect in zekere weefsels een langdurige periode van observatie noodzakelijk is. Het voor mazelen typische cytopathologische effect is dan óók in bovine weefsels waar te nemen. De mogelijkheid mazelenvirus te kweken in bovine cellen werd tot nu toe alleen gemeld door SCHWARZ en ZIRBEL.

Groei van mazelenvirus in lensepitheel van mens of dier vonden wij in de literatuur nergens beschreven.

Eigen experimenten

M a t e r i a a l e n M e t h o d e.

Op lensepithealcultures werd mazelenvirus geënt.

De gebruikte cultures waren bij enting alle afkomstig van vier maanden oude cellijnen, waaruit na 5 passages de subcultures C'aabaa, C'aabab, C'babaa en C'babab waren ontstaan. Voor deze cultures werden media van onze normale samenstelling met 5% kalfserum gebruikt.

Door Dr. F. Dekking werden ons enige stammen mazelenvirus ter beschikking gesteld: 1. Stam Leenders; 2. Stam Huet en 3. de Edmonstonstrain. Het virus werd gesuspenderd in 1 ml Hanks' oplossing en met 9 ml. medium op de cultures gebracht. De eerste enting had plaats op 18-9-1960. De cultures werden twee maal per week verversd. Elke twee dagen werd de cultures gecontroleerd op cytopathologisch effect.

Op 3-11-1960 werden de cultures met trypsine omgezet. Ook in de hieruit ontstane subcultures werd geen cytopathologisch effect gezien.

Op 16-11-1960 werden de subcultures nogmaals omgezet. Van deze cultures bleken op 25-11-1960, de met virus van de stam Leenders geënte flessen, een cytopathologisch effect te vertonen.

Op 29-11-1960 vertoonden ook de cultures die met mazelenvirus van de stam Huet waren geënt een duidelijk cytopathologisch effect.

Resultaten.

Het cytopathologisch effect.

Het meest opvallende blijkt het optreden van een groot aantal multinucleaire reuscellen te zijn. Het aantal kernen per reuscel varieert, maar bedraagt toch meestal wel acht tot tien. De kernen van de reuscellen zijn ongeveer van gelijke grootte. Elders ziet men duidelijk syncytiumvorming zonder dat het direct tot reuscelvorming komt.

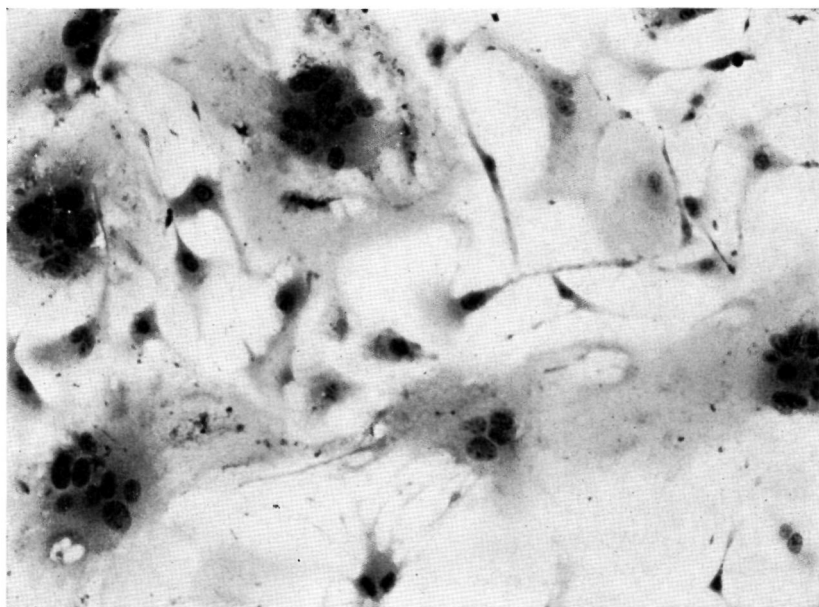


Fig. 18. Cytopathologisch effect van mazelenvirus geënt op
lensepitheel in medium met 5% kalfsserum.

De multinucleaire reuscellen zijn in grote getale te zien.

Kleuring H.H.E. vergr. 125 x.

In de meeste reuscel-kernen zijn duidelijke, veelal polymorphe, eosinophile insluitsels te zien. Deze zijn vaak door een lichte hof van de rest van de kerninhoud gescheiden.

Eosinophile insluitsels ziet men ook in de kernen van verder normale cellen, zonder dat er van reuscelvorming verder sprake is.

De reuscellen, die wij zien bij infectie met mazelenvirus zijn groter dan die, welke men bv. waarneemt bij infectie met bofvirus. Daarbij

ziet men kleine reuscellen met drie tot vijf peripheer liggende kernen, waarin een rond, klein eosinofiel insluitsel ligt.

Er is geen verschil in cytopathologisch effect van virus van de stam Leenders en van de stam Huet.

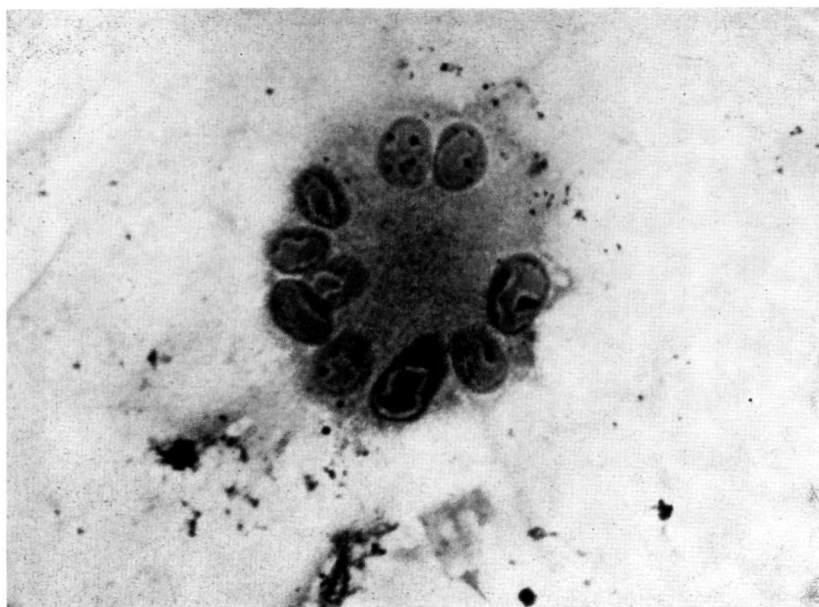


Fig. 19. Cytopathologisch effect van mazelenvirus op lensepitheel.
Grote reuscel met tien kernen, die elk een polymorph,
eosinofiel insluitsel hebben.
Vergr. 400 x. Kleuring H.H.E.

Conclusie: de waarneming van SCHWARZ en ZIRBEL, dat mazelen-virus ook groeit in bovine cellen, kunnen wij dus bevestigen.

Het door ons waargenomen cytopathologische effect van mazelen-virus in lensepitheel, komt geheel overeen met de veranderingen die in andere weefselcultures werden waargenomen en beschreven. Ook voor lensepitheel geldt, dat het vrij lang duurt voor het typische cytopathologische effect optreedt.

HET VACCINIAVIRUS

Bij onze voorgaande onderzoeken en beschouwingen is wel ge-bleken, dat het cytopathologisch effect veroorzaakt door adenovirus,



Fig. 20. Kern met eosinophiel
insluitel in lensepitheelcel. Vergr. 800 x.

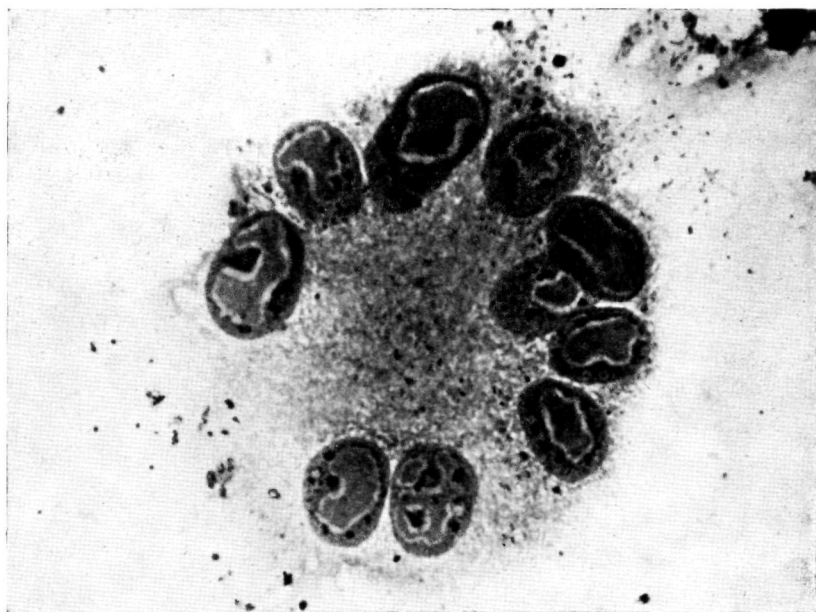


Fig. 21. Reuscel met grillige
eosinophile insluitsels in de kernen. Vergr. 800 x.



Fig. 22. Syncytiumvorming.
Kernen met polymorphe eosinophile insluitsels.
Kleuring H.H.E. Vergr. 800 x.

poliovirus en mazelenvirus in lensepitheel, voornamelijk bestaat uit morphologische veranderingen in de celkern.

Wij hebben onze voorgaande onderzoeken uitgebreid met het infecteren van lensepitheel met vacciniavirus. De uitkomst hiervan zou steun kunnen verlenen aan recente onderzoeken van anderen, die concludeerden dat vacciniavirus zich uitsluitend vermenigvuldigt in het cytoplasma. Intranucleaire insluitsels werden ook met het electronenmicroscop nooit waargenomen. Ofschoon wij sinds enige tijd weten, dat vacciniavirus gedeeltelijk bestaat uit desoxyribonucleinezuur, blijft de wijze waarop dit wordt verkregen en gebruikt door het virus in het duister (RYDEN en RANDALL).

Eigen experimenten

M a t e r i a a l e n M e t h o d e.

Wij hebben enige lensepitheelcultures geënt met vacciniavirus. Hiervoor werden subcultures gebruikt, na 9 passages ontstaan uit de lijn Fbb (een half jaar oud).

Aan 10 ml medium werd 0,1 ml vacciniavirus in een verdunning van 10^{-5} toegevoegd.

Resultaten.

Na 8 uur werden de eerste cytopathologische veranderingen in het lensepitheel waargenomen. Deze bestonden uit sporadische intracytoplasmatische insluitlichaampjes, die meestal dicht bij de kern waren gelegen; zij varieerden van rond tot ovaal en waren gewoonlijk omgeven door een lichte halo. Op de plaats van het insluitsel in het cytoplasma lijkt de kernwand wat ingedrukt; er bestaat veelal een duidelijke concaviteit aan de kant van het insluitsel. Soms is de kernwand ter plaatse wat onregelmatig en geschrompeld. Deze veranderingen waren alle, vooral in het gekleurde preparaat, duidelijk te zien (Fig. 23 en 24).

Insluitsels namen in aantal toe, naarmate de infectie voortschreed. Andere celveranderingen werden niet waargenomen.

18 Uur na de inoculatie zien wij cytoplasmaretractie, vergezeld van



Fig. 23. Cytopathologisch effect van vacciniavirus na 18 uur. Kleuring H.H.E. Vergr. 800 x. Typische insluitsels en indeuking van aangrenzende kernmembraan te zien.

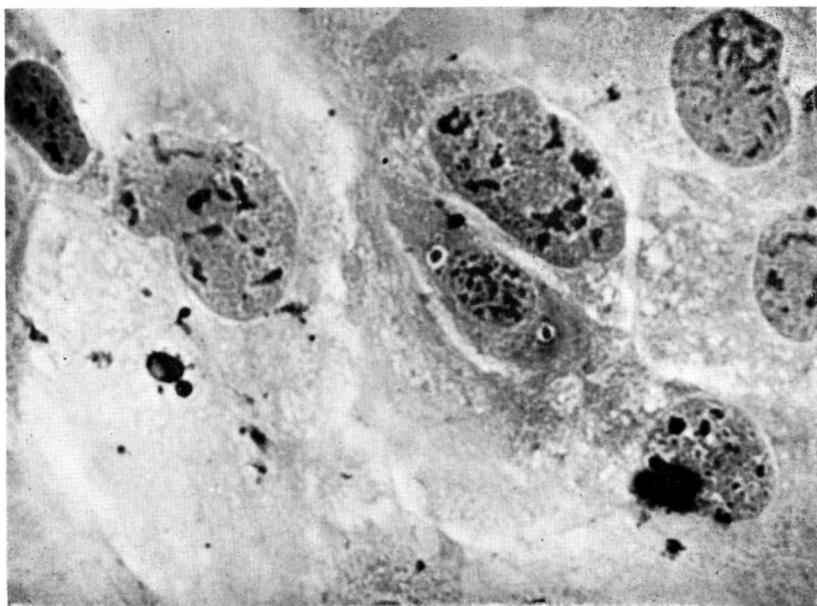


Fig. 24. Cytopathologisch effect van vacciniavirus na 18 uur. Insluitsels met duidelijke lichte halo.

loslating van naburige cellen. Na 48 uur ziet men vrijwel niets meer dan beschadigde en necrotische cellen.

Discussie

Wij kunnen zeggen, dat uit de in dit hoofdstuk beschreven onderzoeken het volgende is komen vast te staan:

1. lensepitheel is gevoelig voor infectie met de daarin besproken virussen.
2. tengevolge van de virusinfectie ontstaat in het lensepitheel een voor dit virus typisch cytopathologisch effect.
3. een bepaald virus is op deze wijze dus aantoonbaar door het daarbij behorende cytopathologisch effect.

HOOFDSTUK VI

ALGEMEEN LITERATUUROVERZICHT OVER DE STRUCTUUR EN DE PERMEABILITEIT VAN DE LENSKAPSEL

De structuur van de lenskapsel

De lens wordt geheel omgeven door de lenskapsel. De dikte van de kapsel is niet overal gelijk, het dikst is ze aan de voorkant, 2 à 3 mm van de pool, achter ligt het dikste deel wat dichterbij de aequator. De kapsel is het dunst aan de achterste pool.

De kapsel bevat geen elastische vezels (NORDMANN). Onder het lichtmicroscopisch heeft ze een homogeen aspect, maar electronenmicroscopisch heeft men een heel fijn en onregelmatig netwerk kunnen vaststellen, wat toch op een zekere structuur duidt. Dit laatste is echter alleen te zien bij zeer jonge kinderen, bij volwassenen heeft men geen enkele structuur kunnen vaststellen (FRIEDENWALD, 1930).

SEBRUYNS (1950) toonde met het electronenmicroscopisch zeer fijne, min of meer regelmatige vacuolen aan. MONAHAN meende met het phase-contrastmicroscopisch een kanaalsysteem in de kapsel te zien. VAN DEN HEUVEL (1956) kon dit echter niet bevestigen.

Onderzoekingen met het phasecontrastmicroscopisch (NORDMANN) hebben aangetoond, dat er nog een afzonderlijke pericapsulaire membraan bestaat. Deze is buitengewoon fijn en is alleen in de buurt van de aequator wat dikker. BUSACCA heeft reeds in 1927 erop gewezen, dat de lenskapsel overal omgeven is door een pericapsulaire membraan.

Onder de gehele voorste lenskapsel ligt een monocellulaire laag epitheelcellen. Deze zijn in de streek van de voorste lenspool plat en worden hoger naar de aequator toe (NORDMANN).

Naarmate de kapsel ouder wordt, ondergaat zij veranderingen. De kapsel neemt in dikte toe tot ± 60 jaar, maar de verdeling van maxima en minima blijft gelijk.

SALZMANN (1912) geeft cijfermateriaal over de dikte van de kapsel bij de mens op leeftijden van 15 dagen tot 71 jaar:

| Leeftijd | Pol.ant. | Dikste deel voorkant | Aeq. | Dikste deel achterkant | Pol.post. |
|----------|----------|-------------------------|---------|---------------------------|-----------|
| 15 d. | 6 μ | 8 μ | 3 μ | 18 μ | 2 μ |
| 9 j. | 8 | 15 | 8 | 22 | 2 |
| 23 j. | 11 | 18 | 14 | 21 | 3 |
| 40 j. | 16 | 22 | 16 | 18 | 3 |
| 56 j. | 18 | 23 | 14 | 16 | 3 |
| 71 j. | 14 | 21 | 9 | 9 | 2,3 |

Bij het rund zijn geen metingen verricht.

Het lensepitheel ondergaat weinig verandering in de loop van het leven.

De cellen worden wat groter en platter naarmate ze ouder worden.

De permeabiliteit van de lenskapsel

De onderzoekers, die hebben getracht de kapselpermeabiliteit na te gaan, hebben hiervoor gebruik gemaakt van de geïsoleerde kapsel of van de totale lens. In het laatste geval heeft men de doordringing in de lens of het uittreden uit de lens door de kapsel nagegaan van gemakkelijk te identificeren stoffen. Het is echter niet altijd mogelijk het aandeel van de kapsel hierin te scheiden van dat van andere lenscomponenten, omdat de kapsel in vivo een integrale laag vormt met de epitheelcellen. Toch zullen wij trachten ons rekenschap te geven van de permeabiliteit van de lenskapsel.

BENCE-JONES was de eerste, die in 1865 onderzoekingen deed over de permeabiliteit van de lenskapsel. Hij onderzocht het binnendringen door de kapsel in de lens van lithium-chloride en andere metaalzouten. Latere onderzoekers gingen over op kleurstoffen en stoffen, die door middel van chemische reacties gemakkelijk waren te identificeren: fluorescine, kalium-jodide en kalium-ferrocyanide.

Aangetoond kon worden, dat een hele reeks stoffen de kapsel kan passeren. Men bleef zich echter afvragen of deze passage geschiedt via gepreformeerde kanalen of in poriën.

Wanneer men het binnendringen in de lens nagaat van stoffen na intraveneuze injectie, dan vindt men deze soms alleen terug in de aequatorstreek. Deze voorkeur kan het gevolg zijn van de nabijheid van de ciliaire vaten en de traagheid van diffusie in de lens. Mogelijk speelt hierbij ook de hoge stofwisseling van de cellen daar een rol. Het zou niet juist zijn hieruit te concluderen, dat de plaats van de

grootste permeabiliteit die van de aequator is. Uit experimenten, waarbij men stoffen in het oog heeft gespoten blijkt trouwens, dat de permeabiliteit van de achterste kapsel niet mag worden verwaarloosd.

LEBER (1903) meende dat de permeabiliteit in de aequator en door de achterste kapsel gelijk is; hij twijfelde aan de doorlaatbaarheid van de voorste lenskapsel.

MAGNUS (1890) en ULRICH (1898) beweren dat er tussen de voorste en achterste kapsel slechts quantitatieve verschillen bestaan in permeabiliteit. De passage van stoffen door de achterste kapsel zou vier tot zeven maal gemakkelijker gaan dan door de voorste.

Bij deze mededelingen uit de oudere literatuur moeten wij echter rekening houden met waarnemingsfouten.

De doorlaatbaarheid van de voorste lenskapsel wordt nog bewezen door waarnemingen gedaan bij de alloxaan-diabetes, naphthaline-intoxicatie en bij chalcosis lentis, waarbij de veranderingen onder de voorste kapsel precies corresponderen met de configuratie van iris en pupilopening.

Men neemt dan ook als vaststaand aan, dat alle delen van de lenskapsel doorlaatbaar zijn.

De mate van permeabiliteit voor verschillende stoffen is door vele onderzoekers nagegaan.

FRIEDENWALD heeft hierover de meest volledige en uitgebreide proeven genomen. Zijn conclusies zijn gebaseerd op de resultaten verkregen na injecties in het glasvocht van levende en geënuceerde ogen en bij proeven met de gehele lens in vitro. Hij toont in de eerste plaats aan, dat wat betreft alle door hem gebruikte stoffen de kapsel zich als een semi-permeabele membraan gedraagt. Zij is doorlaatbaar voor alle electrolyten en suikers. De permeabiliteit voor de suikers vermindert met de toename van het moleculairgewicht. Hetzelfde geldt voor kleurstoffen. Verder toont hij aan, dat electropositieve colloïden gemakkelijker doordringen dan negatief geladen deeltjes. Haemoglobine passeert gemakkelijk, maar praecipitinen, agglutininen en proteolytische enzymen uit het kamerwater gaan niet door de kapsel. De permeabiliteit blijkt voor verschillende individuen aanzienlijk te verschillen. Ondanks de zeer verschillende kapseldikte is de gemiddelde permeabiliteit bij runderen, varkens en konijnen van dezelfde orde van grootte.

Kortom, FRIEDENWALD toont aan, dat de lenskapsel zeer permeabel is en dat slechts enkele stoffen met hoog moleculairgewicht niet passeren. •

De permeabiliteit van de lenskapsel is later bevestigd in publicaties van GIFFORD, LEBENSOHN en PUNTENNY, GIVNER en GANNON, BELL-OWS en CHINN, BAKKER en REISNER.

Aan de andere kant geeft de aanwezigheid in de lenskapsel van aanzienlijke hoeveelheden glutathion en nucleotiden (DISCHE en ZIL, 1951 en DISCHE, EHRLICH, MUNOZ en SALLMANN, 1953) een nieuwe aanwijzing voor een zekere metabole activiteit in de kapsel.

De permeabiliteit van de lenskapsel neemt af met de leeftijd (FRIEDENWALD; GIFFORD).

Voor de meeste stoffen staat thans de doorlaatbaarheid van de lenskapsel wel vast.

Publicaties over onderzoekingen naar de doorlaatbaarheid van de kapsel voor virussen ontbreken echter tot nu toe. Over de permeabiliteit van grensmembranen voor virussen is tot op heden niets bekend. Deze wijze waarop de bacteriophage op een bacterie inwerkt is wel bekend. Deze gegevens mag men echter niet overbrengen op virussen van mens en dier.

In de volgende hoofdstukken zullen wij ons bezighouden met de doorlaatbaarheid van de lenskapsel voor virussen en de experimenten, die wij met betrekking tot deze vraagstelling uitvoerden, beschrijven.

HOOFDSTUK VII

DE DOORLAATBAARHEID VAN DE LENSKAPSEL VOOR VIRUSSEN

Voor onze onderzoeken in vitro naar de doorlaatbaarheid van de lenskapsel voor virussen, moest voldaan worden aan twee voorwaarden:

1. tijdens de proeven in vitro moest de physiologische en morphologische integriteit van lens en lenskapsel zo goed mogelijk gewaarborgd worden.
2. de proefopstelling moest zodanig zijn, dat het incuberen van lenzen in virushoudend medium op eenvoudige wijze en op gestelde tijden was te verwezenlijken, met uitsluiting van secundaire bacteriële infecties.

MATERIAAL EN METHODE

Voor het in vitro doen overleven van lenzen werd reeds vroeger door enige onderzoekers een techniek ontwikkeld.

DE HAAN paste de doorstromingscultuur toe, die later door BAKKER verder werd ontwikkeld om konijnlenzen in vitro te doen overleven. BAKKER plaatste de lens van een konijn in kleine lucht- en waterdichte kamertjes, die doorstroomd werden met een steriele oplossing van Ringer, die enige dagen in peritoneaalholte van een konijn had verkeerd. Op deze wijze kon hij de lenzen enige tijd helder houden en aantonen dat de lens zijn normale concentratie ascorbinezuur behoudt. Het zuurstofverbruik bleef vrijwel constant. In microscopische preparaten van overlevende konijnlenzen kon BAKKER na acht dagen nog mitosen aantonen, als bewijs dat de lenzen hun vitaliteit nog volkomen hadden bewaard.

VON BAHR gebruikte bij de bestudering van het effect van calcium-deficientie op de stofwisseling van de overlevende lens eveneens de doorstromingsmethode. Hij gebruikte als doorstromingsvloeistof een

synthetisch medium met 0,7% serum. Op deze wijze gelukte het hem de lens gedurende ongeveer tien dagen helder te houden.

MERRIAM en KINSEY beschrijven de zogenaamde „batch”-techniek waardoor het mogelijk is, lenzen in vitro lange tijd (ongeveer drie weken) te doen overleven, met handhaving van de physiologische en morphologische integriteit van lens en kapsel. Zij gebruikten deze techniek voor hun onderzoekingen naar quantitatieve veranderingen in de stofwisseling van de lens.

Deze zogenaamde „batch”-techniek van MERRIAM en KINSEY werd, met enige modificaties, door ons gebruikt voor onze experimenten.

APPARATUUR

Deze bestaat uit vier cultuurbuizen van Jena-glas, een waterbad van constante temperatuur, een kleine electromotor, die voor de continue schommelbeweging van de cultuurbuizen zorgt en een gaswisselingssysteem.

De cultuurbuis

Deze heeft een wijde opening A, waardoor het medium gemakkelijk steriel kan worden ververst en de lens kan worden ingebracht. In de glaswand is een uitbocht B aanwezig; hierin komt de lens te liggen met de voorste kapsel naar boven gericht. De kleinere opening C dient voor de aanvoer van het gasmengsel, dat de buis weer verlaat door de opening D in de afvoerbuis. De cultuurbuizen worden op normale wijze, na afsluiting met drie wattenproppen, gesteriliseerd.

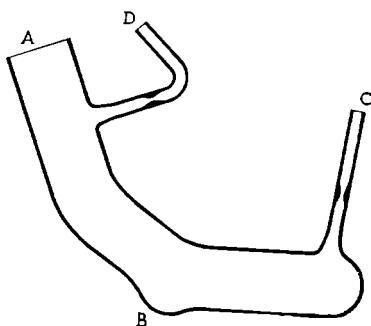


Fig. 25. Cultuurbuis.

Het waterbad

Voor het handhaven van een constante temperatuur van lens en medium maken wij gebruik van een waterbad. De lens wordt aseptisch in een steriele cultuurbuis gebracht, die 10 ml medium bevat; de buis wordt in het waterbad geplaatst van constante temperatuur (37°C). Vier van deze cultuurbuizen tegelijk, kunnen door middel van buretklemmen naast elkaar worden bevestigd aan de as van het electromotortje. Het medium kan zeer gemakkelijk worden ververs.

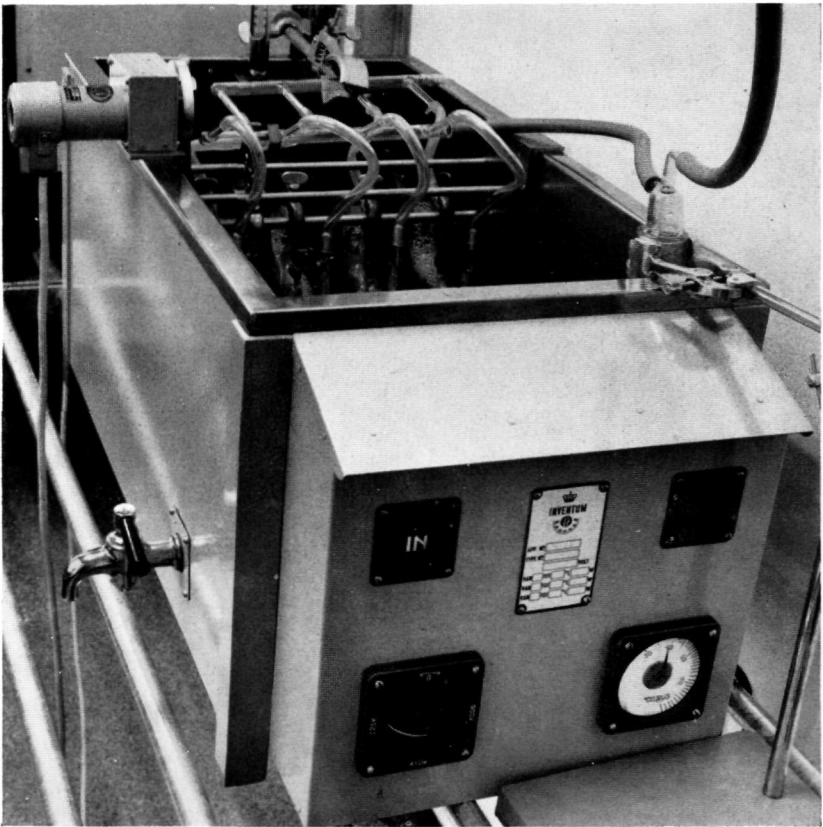


Fig. 26. Apparaat voor lenscultures.

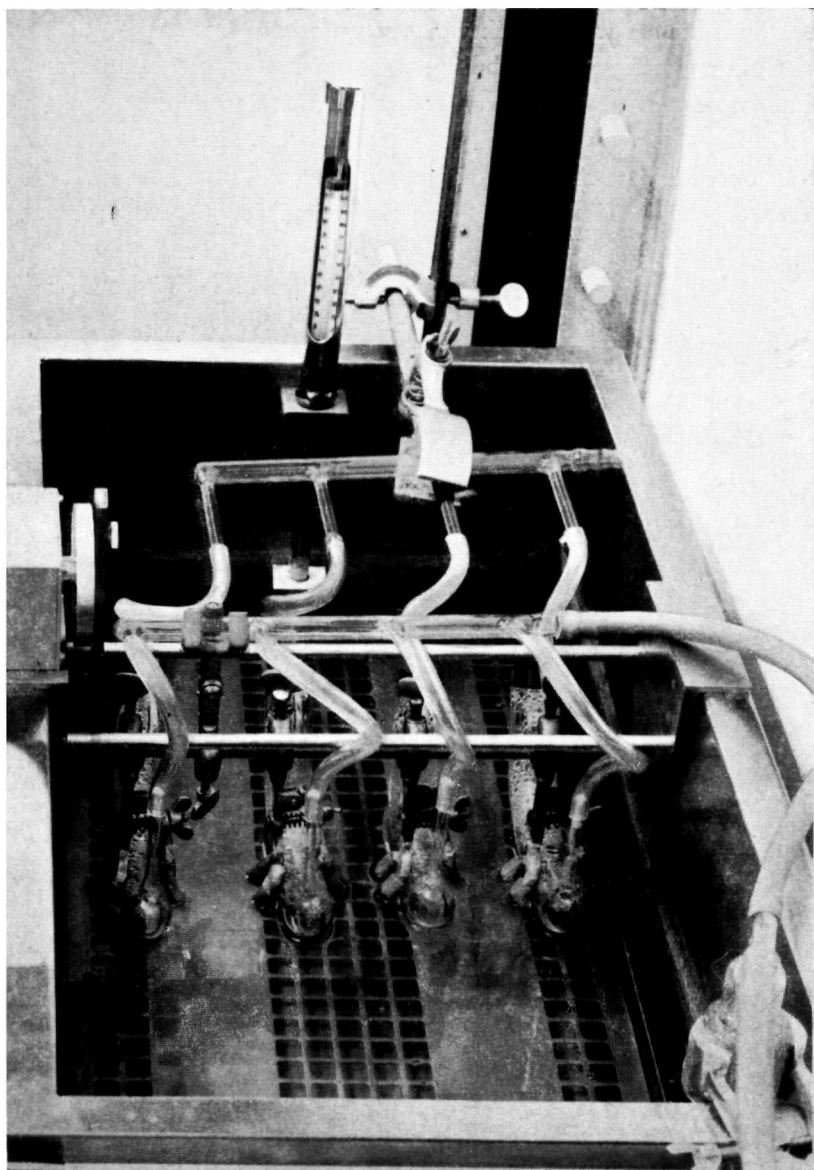


Fig. 27. Apparaat voor lenscultures.

Het bewegingsapparaat

Het mechanische bewegingsapparaat dient om locale verschillen in concentratie van stofwisselingsproducten tengevolge van de langzame difussie in de vloeistof, zoveel mogelijk te verminderen. De langzaam schommelende beweging van de cultuurbuizen wordt onderhouden door een electromotortje. Deze motor blijft gedurende elk experiment continu lopen en doet de as twee maal per minuut over een hoek van 25° heen en weer draaien.

Het gaswisselingssysteem

Voor toevoer van zuurstof voor de respiratie en koolzuur voor het handhaven van de koolzuur-bicarbonaat-buffer wordt gezorgd door een gaswisselingssysteem. Het gasmengsel wordt gedeeltelijk met waterdamp verzadigd door het door een gaswasfles te voeren, welke in de hoek van het waterbad onder water is aangebracht. Het gas bereikt de dunne aanvoerbuiscjes C, vanuit een gemeenschappelijke toevoerbuisc. In de aanvoerbuiscjes C is een vernauwing aangebracht om de gasdruk te reduceren.

MERRIAM en KINSEY gebruikten oorspronkelijk een gasmengsel bestaande uit lucht met 5% koolzuur voor al hun experimenten. Later gebruikten zij een gasmengsel van 5% zuurstof, 5% koolzuur en 90% stikstof. Deze verandering in de samenstelling van het gasmengsel geeft een zuurstofspanning die meer gelijk op die in het kamerwater van konijnen en runderen. Bij onze eigen experimenten hebben wij ook steeds gebruik gemaakt van het laatst genoemde mengsel. De totale gastoevoer voor vier cultuurbuizen samen bedraagt steeds ongeveer 1 liter per uur.

Het medium

Bij hun proeven met overlevende lenzen maakten MERRIAM en KINSEY gebruik van verschillende media. Bij hun eerste experimenten gebruikten zij een medium dat bestond uit een oplossing van verschillende zouten met dextrose. De pH van dit medium was 7,4. Later gingen zij over tot het gebruik van een ander medium, dat gebaseerd was op meer recente analyses van konijnenglasvocht en dat afgeleid was van het eerste medium; hieraan werd melkzuur en ureum toegevoegd. De zuurgraad hiervan was 7,5. Zij maakten verder nog

gebruik van een derde medium, kamerwater van het rund, verkregen binnen 15 minuten na de dood van het dier, waaraan 1,0 % dextrose-oplossing ter verhoging van de glucoseconcentratie werd toegevoegd.

Bij onze proeven hebben wij voornamelijk gebruik gemaakt van een medium van nog recentere samenstelling, het door MORGAN, MORTON en PARKER geïntroduceerde medium no. 199. Dit medium is zeer complex, door toevoeging van vele aminozuren, vitaminen en andere stoffen, die in bovengenoemde media niet aanwezig waren. De pH van dit medium is 7,4. Wij gebruikten in elke cultuurbuis 10 ml medium, voldoende om de lens voortdurend omspoeld te houden met vloeistof. Aan elke 10 ml medium werd 0,5 ml penicilline en 0.02 ml streptomycine toegevoegd. Het medium werd twee maal daags ververs.

Modificaties

De methode van MERRIAM en KINSEY werd door enige modificaties voor onze experimenten geschikt gemaakt.

De cultuurbuis, die zij ontwierpen voor hun proeven met konijnenlenzen in vitro, werd door ons gemodificeerd naar afmetingen en model teneinde deze geschikt te maken voor de veel grotere kalfslenzen, die wij gebruikten.

Wij hebben ook, zoals reeds beschreven, een medium gebruikt dat aan hogere eisen voldoet. Alhoewel MERRIAM en KINSEY slechts een maal per dag hun medium verversen, meenden wij dit twee maal daags te moeten doen om een constante samenstelling en pH nog beter te kunnen handhaven.

Bij de experimenten hebben wij uitsluitend gebruik gemaakt van kalfslenzen. De ogen werden direct na de dood van het dier verwijderd en zo snel mogelijk naar het laboratorium getransporteerd. Voor het prepareren van de lens werd de reeds eerder in hoofdstuk II beschreven methode toegepast. Nadat wij er ons van vergewist hebben, dat er zich geen resten van corpus ciliare aan de lens bevinden, wordt deze voorzichtig met een steriel lepeltje in het reeds van medium voorziene cultuurvat gelegd. De cultuurbuis wordt daarna met een steriele gummistop gesloten en door middel van een buretklem aan de motoras bevestigd. Daarna worden de slangetjes van gasaan- en afvoerbuis aangesloten en het electromotortje ingeschakeld.

EIGEN EXPERIMENTEN

A. *Controle van de proefopstelling*

1. Experimenten met kalfslenzen in normaal medium.

Bij elke proef werden tegelijk vier kalfslenzen op de beschreven wijze geprepareerd. De cultuurbuizen werden gevuld met 10 ml medium no. 199. Elke 10 ml medium werd bereid door aan 1 ml uitgang medium 9 ml aqua bidest toe te voegen en 0,5 ml NaHCO_3 om de zuurgraad op 7,4 te brengen, hetgeen met de pH-reeks werd gecontroleerd. Hieraan werd dan nog penicilline en streptomycine in de gebruikelijke concentratie toegevoegd.

De helderheid van de lenzen kon gemakkelijk dagelijks worden gecontroleerd met behulp van een electrisch handspleetlampje. Hier-voor is slechts nodig de cultuurbuis enige minuten uit het waterbad te verwijderen. Op deze wijze bleek het ons mogelijk onze kalfslenzen vrijwel steeds drie weken geheel helder en transparant te houden.

Gedurende elke proefperiode werd het medium steeds twee maal per dag ververs, terwijl de cultuurbuizen dag en nacht in continue beweging gehouden werden.

2. Experimenten met het in weefselcultuur voortkweken van lensepitheel afkomstig van overlevende lenzen.

Daar bekend is, dat het helder blijven van de lens in vitro als zodanig, geen voldoende bewijs is voor zijn vitaliteit en physiologische en morphologische integriteit (VAN DEN HEUVEL, 1956), hebben wij nagegaan of het lensepitheel van de overlevende lens nog in cultuur gebracht kan worden en kan worden voortgekweekt.

Experiment: hiertoe werden tegeliktijd vier kalfslenzen geprepareerd en in de bovenbeschreven cultuurbuizen in medium no. 199 gelegd en in onze proefopstelling geplaatst.

De eerste lens werd na twee dagen, de tweede na vier dagen, de derde na zes dagen en de vierde na tien dagen uit de cultuurbuis genomen. Alle lenzen bleken nog helder te zijn en vertoonden ook aan de aequator geen enkele troebeling.

Op de in hoofdstuk II beschreven wijze werd nu van de lens een

stukje van de voorste lenskapsel met het daarmee verbonden epitheel op de bekende wijze in een cultuurfles met 10 ml medium (zie pag. 12) niet 30% kalfsserum gelegd en bij 37° C in de broedstoof geïncubeerd. Na zes dagen werd het medium voor de eerste maal ververs, later twee maal per week.

R e s u l t a a t:

Na twee tot drie weken bleek, dat het lensepitheel afkomstig van deze lenzen tot een monocellulaire laag uitgroeide. In het gekleurde preparaat bleken de cellen morphologisch geheel gelijk te zijn aan de cellen in cultures afkomstig van verse kalfslenzen, zoals wij deze reeds uitvoerig in hoofdstuk IV beschreven.

Conclusie

De vitaliteit van op deze wijze overlevende lenzen is, tenminste gedurende de eerste tien dagen, voldoende gewaarborgd.

B. Adsorptie en penetratie van virus

1. B e s c h o u w i n g t e r i n l e i d i n g v a n h e t e x p e r i m e n t.

Alvorens wij overgaan tot de beschrijving van onze derde serie experimenten, waarbij kalfslenzen enige tijd in virushoudend medium worden geïncubeerd, moeten wij eerst een beschouwing wijden aan hetgeen hierbij eigenlijk gebeurt.

Virussen zijn in staat verschillende weefsels in verschillende dieren te infecteren. Cellen in weefselkweek zijn in het algemeen meer gevoelig voor infectie dan die in het intacte organisme.

Hoe een virus in een cel geraakt is niet precies bekend. Een virus wordt in het algemeen snel door haar gastheercel geadsorbeerd. Gedurende de vroegste phase van adsorbtie van het virus, is dit nog toegankelijk voor antilichamen en deze initiale phase wordt gevolgd door penetratie. Na penetratie wordt het virus onvatbaar voor de werking van antiserum (RUBIN en FRANKLIN).

Adsorptie aan cellen wordt niet altijd gevolgd door penetratie en infectie. Hoe penetratie van een virus precies plaats heeft is tot nu toe onbekend. Heeft na adsorptie penetratie plaats, dan volgt een periode waarin het grootste deel van het virus niet is aan te tonen

als infectieus virus. Aantoonbaar is het virus pas weer na deze eclipsperiode, wanneer het zich vermenigvuldigt.

FARNHAM en NEWTON deden adsorptie- en penetratie-experimenten met herpesvirus en HeLa-cellen. Zij definiëren virusadsorptie als: formatie van een virus-cel-complex, bestand tegen herhaald wassen. Bij hun proeven met herpesvirus stelden zij vast, dat bijna al het geïnoculeerde virus in drie uren was geadsorbeerd aan de HeLa-cellen, onafhankelijk van de temperatuur. De hoeveelheid virus, gebonden door adsorptie bij een willekeurige temperatuur, noemden zij de totale hoeveelheid geadsorbeerd virus.

Zij gingen ook de penetratie van herpesvirus in HeLa-cellen na. Zij definiëerden gepenetreerd virus, als virus dat niet wordt gebonden door antiserum. Een bepaald percentage van de totale hoeveelheid geadsorbeerd virus penetreert in de cellen en is voor onbepaalde tijd serum-ongevoelig. De penetratie van herpesvirus in HeLa-cellen bleek, in tegenstelling met adsorptie van viruspartikels, temperatuur gevoelig. De hoeveelheid gepenetreerd virus bleek bij 37° C groter dan bij 30° C; bij 4° C bleek een veel geringere hoeveelheid virus te penetreren. Door eenvoudige wassingen wordt het niet-geadsorbeerde virus verwijderd. Behandeling van de cellen met antiserum gedurende een uur bij 37° C verwijdert het geadsorbeerde virus. Door verdere wassingen worden dan de antilichamen verwijderd. Wat dan nog in de cellen resteert, is gepenetreerd virus.

Bij hun penetratie-experimenten incubeerden FARNHAM en NEWTON celcultures met virushoudend medium, evenals bij hun adsorptie-experimenten, gedurende drie uren. De cultures werden bij verschillende temperatuur geïncubeerd. Het inoculum werd van de cultures afgegoten na drie uur en vervangen door medium met 10% immuunserum. De cultures werden nu gedurende twee uur bij 37° C in de broedstoof geplaatst. Hierna werd ook dit medium afgegoten en werden de cultures drie maal gewassen met normaal medium. De hoeveelheid gepenetreerd virus werd daarna bepaald.

SCOTT, MC LEOD en TOKUMARU deden eveneens dergelijke adsorptie- en penetratie-experimenten, met herpesvirus en weefselcultures van konijnennier en menselijke amnioncellen. De totale hoeveelheid virus die in twee uur bij 37° C werd geadsorbeerd, werd bepaald. De hoeveelheid gepenetreerd virus werd eveneens bepaald, na twee uur adsorptie, toevoeging van medium met 5 % antiserum gedurende

een uur en vervolgens vier wassingen. Zij berekenden nu voor hun herpesstammen de mate van adsorptie en penetratie: 87-90 % werd geadsorbeerd uit het eerste inoculum, 100-88 % van het geadsorbeerde virus penetreerde binnen de twee uur bij 37° C.

Wanneer de lens gedurende enige tijd in aanraking komt met virushoudend medium, kan een gedeelte van het virus aan de kapsel worden geadsorbeerd; de rest zal in het medium aanwezig blijven zolang dit niet wordt vervangen door vers, niet-virushoudend medium.

Het aan de lens geadsorbeerde gedeelte van het geïnoculeerde virus kan door antiserum gebonden worden. In de lens gepenetreerde viruspartikels zullen echter niet door dit antiserum gebonden worden. Bij onze volgende experimenten zijn wij van deze stellingen uitgegaan. De eerste reeks experimenten noemden wij adsorptie-experimenten omdat het geadsorbeerde virus hierbij niet door middel van antiserum werd verwijderd. Bij onze tweede reeks experimenten, die wij penetratie-experimenten zullen noemen, werd alle geadsorbeerde virus verwijderd door binding aan antiserum.

2. Experimenten met kalfslenzen in virus-houdend medium.

a. Adsorptie-experimenten.

Experiment: vier verse kalfslenzen werden geprepareerd en in vier cultuurbuizen van onze proefopstelling gelegd.

In de eerste drie buizen werd 9 ml medium gedaan, aangevuld met 1 ml suspensie van adenovirus type 7 van een verdunning van 10^{-1} .

In de laatste buis werd 10 ml medium gedaan.

De incubatie van de eerste drie lenzen in het virushoudend medium duurde drie uur. Het geïnoculeerde medium werd daarna afgegoten en de drie lenzen vervolgens gewassen met normaal medium, gedurende 48 uur zes maal, waarbij bovendien het medium werd ververs.

Ook het medium van de contrôlelens werd zes maal ververs.

Ten einde na te gaan, of er adsorptie aan de lens had plaats gevonden, werden nu de lenzen een voor een, streng gescheiden, uit de cultuurbuizen verwijderd. Elke lens werd nu in een apart steriel mortier stukgeknipt en daarna zorgvuldig fijn gewreven. Nadat aan

deze lensmassa 1 ml normaal medium was toegevoegd, werd deze in een cultuurbuisje overgegoten en in de vrieskast gelegd.

Nadat de inhoud van de buizen zes maal bevroren was tot -70°C en ontdooid tot kamertemperatuur, werd deze overgeschonken in centrifugebuizen en gedurende tien minuten op 8000 toeren afgecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd afgepipetteerd en toegevoegd aan de 9 ml normaal medium van een normaal groeiende cultuur van lensepitheel-cellen.

De drie lensepitheelcultures, waaraan de bovenstaande vloeistof afkomstig van de eerste drie lenzen was toegevoegd, vertoonden na acht dagen het voor adenovirus type 7 typische cytopathologische effect, zoals dit eerder in hoofdstuk V uitvoerig werd beschreven.

In de vierde lensepitheelcultuur, waaraan dus vloeistof werd toegevoegd afkomstig van een lens, die niet aan virusadsorptie was blootgesteld geweest, werd geen enkele morphologische verandering waargenomen.

Het laatst afgeschonken medium van de overlevende lenzen werd gedurende drie uur op normaal groeiende lensepitheelcultures gebracht. Hierna was nooit enige cytopathologisch effect waar te nemen.

Conclusie

Uit deze experimenten blijkt, dat adenovirus een tegen wassen bestendige binding aangaat met de lens. Het door middel van het cytopathologische effect in normaal groeiend lensepitheel aangetoonde virus kan slechts van de lens afkomstig zijn, daar het laatst afgeschonken medium geen virus meer bevatte.

Of dit van de lens afkomstige virus alleen hieraan geadsorbeerd is geweest, of voor een groter of kleiner gedeelte ook in de lens pene treerde, hebben wij met de hierna volgende experimenten trachten na te gaan.

b. Penetratie-experimenten.

Om na te gaan, of er behalve adsorptie ook viruspenetratie in de lens plaats heeft, hebben wij gebruik gemaakt van de mogelijkheid geadsorbeerd virus te verwijderen door middel van antiserum.

I. Experimenten met adenovirus type 7:

Opnieuw werden tegelijkertijd vier verse kalfslenzen geprepareerd

en in de vier cultuurbuizen van onze proefopstelling gelegd.

In de eerste drie buizen werd wederom 9 ml medium gedaan, aangevuld met 1 ml suspensie van adenovirus type 7 van een verdunning van 10^{-1} .

In de laatste buis werd 10 ml normaal medium gedaan.

De eerste drie lenzen verbleven drie uur lang in het virushoudende medium. Het geïnoculeerde medium werd daarna afgeschonken, waarna de lenzen vervolgens vier maal gewassen werden met normaal medium.

Bij de eerste twee lenzen werd thans 9 ml normaal medium gedaan, waaraan 1 ml konijnen-antiserum werd toegevoegd.

Bij de derde en vierde lens werd aan 9 ml normaal medium 1 ml normaal konijnenserum toegevoegd.

Het door ons gebruikte antiserum (KNS antitype 7) bleek bij titratie op het virologisch laboratorium de door ons gebruikte suspensie adenovirus type 7 nog te neutraliseren in een verdunning van 1 : 1024 (100 TCD₅₀).

De eerste twee lenzen werden nu gedurende twee uur bij 37° C met het antiserum geïncubeerd, terwijl gedurende dezelfde tijd de derde en vierde lens bij dezelfde temperatuur met normaal konijnenserum werden geïncubeerd.

Na twee uur werden de media afgeschonken en werden de lenzen vervolgens een voor een met normaal medium gewassen. De lenzen werden daarna, stuk voor stuk, streng gescheiden, in een apart steriel mortier fijngevreven en ingevroren. Na zes maal bevroren en ontdooien werd gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof geoogst.

Met de geoogste vloeistoffen werden daarna vier normaal groeiende lensepitheelcultures bedekt, waarna nog 9 ml normaal medium werd toegevoegd.

Elke dag werden de cultures gecontroleerd op mogelijk optredend cytopathologisch effect. Wanneer in het natieve preparaat celveranderingen begonnen zichtbaar te worden, werd een gekleurd preparaat gemaakt.

Resultaten:

De eerste twee lensepitheelcultures vertoonden na 8 dagen een voor adenovirus typisch cytopathologisch effect.

De derde lensepitheelcultuur vertoonde reeds na 6 dagen eenzelfde typisch beeld.

De vierde cultuur vertoonde geen morphologische afwijkingen. Wij hebben deze proeven verscheidene malen herhaald. Steeds kwamen wij tot deze zelfde resultaten, met een geringe variatie in het tijdstip van optreden van de cytopathologische veranderingen.

Conclusie

In de eerste twee cultures hebben wij virus aangetoond, dat niet door ons antiserum werd geneutraliseerd en dus in de lens moet zijn gepenetreerd. Dit is slechts dan mogelijk, wanneer de lenskapsel voor deze viruspartikels doorlaatbaar is.

Het in de derde cultuur aangetoonde virus is niet met neutraliserende antilichamen in aanraking geweest; hier hebben wij dus te maken met het geadsorbeerde én gepenetreerde virus.

Een quantitative verhouding tussen adsorptie en penetratie kunnen wij niet opgeven, daar quantitative titraties buiten het bestek van ons onderzoek vielen.

De vierde cultuur, die wij als controle cultuur kunnen beschouwen, laat het voor lensepitheelcellen normale beeld zien.

II. Experimenten met poliovirus type 1 :

Vier verse kalfslenzen werden geprepareerd en in de vier cultuurbuizen van de proefopstelling gelegd. In de eerste twee buizen werd 10 ml normaal medium gebracht. In de andere twee cultuurbuizen werd 9,9 ml medium gebracht, aangevuld met 0,1 ml suspensie van poliovirus type 1 in een verdunning van 10^{-3} . De lenzen in deze laatste cultuurbuizen verbleven drie uur lang in het poliovirushoudend medium. Het geïnoculeerde medium werd daarna afgeschonken, waarna de lenzen vervolgens vier maal gewassen werden met normaal medium.

Vervolgens werd aan deze lenzen 9,75 ml normaal medium toegevoegd; hierbij werd dan 0,25 ml antiserum tegen poliovirus gepipetteerd. Het door ons gebruikte antiserum bleek bij voorgaande titratie * op het laboratorium voor gezondheidsleer het door ons gebruikte poliovirus type 1 nog te neutraliseren in een verdunning van 1:1024 (100 TCD₅₀).

Deze laatste lenzen werden vervolgens gedurende drie uur bij

37° C met antiserum geïncubeerd, terwijl de twee eerste lenzen, waaraan dus slechts 10 ml normaal serum was toegevoegd, dienden ter controle.

Na drie uur werden de media afgeschonken; die van de twee laatste lenzen werden apart in een steriele cultuurbuis opgevangen.

De vier lenzen werden daarna weer, stuk voor stuk, streng gescheiden, in een apart steriel mortier fijngegreven en ingevroren. Na zes maal bevriezen en ontdooien werd gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof geoogst.

Met de geoogste vloeistoffen werden daarna normaal groeiende lensepitheelcultures en HeLa-celcultures beënt: aan elke 0,8 ml normaal medium werd 0,2 ml van de geoogste vloeistof toegevoegd.

Elke 24 uur werden deze cultures gecontroleerd op het optreden van een mogelijk cytopathologisch effect.

Resultaten :

De weefselcultures, waaraan geoogste vloeistof afkomstig van de niet geïnfecteerde contrôle-lenzen was toegevoegd, vertoonden geen enkele morphologische afwijking.

De lensepitheelcultures zowel als de cultures van HeLa-cellen, waaraan geoogste vloeistof afkomstig van de andere, wel geïnfecteerde lenzen was toegevoegd, vertoonden reeds na 24 uur een duidelijk cytopathologisch effect, terwijl na 48 uur de degeneratie vrijwel totaal was.

Het laatst afgeschonken medium bleek in geen enkel geval enig cytopathologisch effect te veroorzaken, wanneer dit werd gebracht op normaal groeiende weefselcultures.

Conclusie

Uit deze experimenten blijkt, dat poliovirus type 1 in de lens moet zijn gepenetreerd.

* De titraties werden verricht in het laboratorium voor de gezondheidsleer van Prof. Dr. J. van der Veen.

HOOFDSTUK VIII

SAMENVATTING

Na een inleiding, waarin het doel van dit onderzoek omschreven wordt, volgt in het eerste hoofdstuk een beschouwing over de belangrijke plaats die de weefselcultuur sinds een tiental jaren in de virologie inneemt. Er wordt gewezen op drie omstandigheden, die tot deze ontwikkeling hebben bijgedragen: het inzicht, dat vele virussen bij hun vermenigvuldiging in de cellen van de weefselcultuur een typisch cytopathologisch effect veroorzaken; de ontwikkeling van de antibiotica en hun toepassing bij het werken met weefselcultures; tenslotte de door DULBECCO en VOGT ingevoerde methode waarbij uitgaande van getrypsineerde cellen, monocellulaire lagen worden verkregen.

In het tweede hoofdstuk wordt de techniek van het kweken van lensepitheel besproken. Ons materiaal bestond voornamelijk uit kalfslenzen. De wijze van prepareren wordt behandeld en de primaire explantatie beschreven. Uiteengezet wordt hoe een continue cellijn wordt verkregen.

In het derde hoofdstuk wordt onze techniek van het gekleurde preparaat van gecultiveerd lensepitheel beschreven. Gebruik wordt gemaakt van de directe methode, waarvoor men cellen op glasstripjes, die in de cultuurfles gelegd worden, laat groeien. Wanneer de glasstripjes voldoende zijn begroeid worden ze uit de fles genomen, waarna de cellen gefixeerd en gekleurd worden. Na fixatie met de vloeistof van CARNOY werd meestal gebruik gemaakt van de ijzerhaematoxyline-kleuring volgens HEIDENHAIN. De methode wordt beschreven.

Het vierde hoofdstuk is gewijd aan de beoordeling van lensepitheelcellen in het gekleurde preparaat van normaal groeiende weefselcultures. Aan de hand van enige microphotos wordt de morfologie van kern en protoplasma besproken. De invloed van de serumconcentratie in het medium werd onderzocht. Het blijkt dat lensepitheelcellen ook in medium dat minder dan 20% kalfsserum bevat uitstekend zijn voort te kweken.

De invloed van een overmaat antibiotica en van de zuurgraad van het medium op de weefselkweek wordt besproken.

In het vijfde hoofdstuk wordt eerst een beschouwing gewijd aan het beënten van weefselkweken met verschillende virussen. Er wordt op gewezen dat er over virusgroei in gecultiveerd lensepitheel vrijwel nooit iets in de literatuur werd vermeld. VAN DER VEEN en HEYEN beschrijven groei van adenovirus in lensepitheel, maar maakten geen gekleurde preparaten.

Eigen experimenten met adenovirus, poliovirus, mazelenvirus en vacciniavirus worden uitvoerig besproken.

Adenovirus type 3 en type 7 werden op lensepithealcultures geënt. De cytopathologische veranderingen blijken gelijk te zijn aan die in HeLa-cellen en apenniercellen. Verschil in cytopathologisch effect tussen adenovirus type 3 en type 7 werd niet waargenomen. Het cytopathologische effect in lensepitheelcellen wordt uitvoerig besproken en met photo's geïllustreerd.

Alhoewel over het algemeen aangenomen wordt, dat poliovirus slechts groeit in weefselcultures van cellen, afkomstig van primaten en ook in de literatuur vrijwel nooit iets anders werd beschreven, bleek toch poliovirus type 1 in lensepitheel afkomstig van kalbslenzen, cytopathologische veranderingen te geven. Zowel in de primaire cultuur als na passage waren deze cytopathologische veranderingen te zien. In het gekleurde preparaat blijken deze zeer veel gelijkenis te vertonen met die in HeLa-cellen.

Vervolgens worden onze experimenten met mazelenvirus beschreven. Vóór 1959 slaagde men er niet in mazelenvirus te kweken op bovine cellen. SCHWARZ en ZIRBEL slaagden er dat jaar voor het eerst in dit virus te kweken in bovine nierweefselcultures. Na enting van mazelenvirus op lensepitheelcellen bleek zestig dagen later, na twee passages, een typisch cytopathologisch effect op te treden. Het verschijnen van multinucleaire reuscellen, eosinophile insluitsels in de meeste kernen, syncytiumvorming en het voorkomen van onregelmatige massa's eosinofiel materiaal in het cytoplasma wordt uitvoerig beschreven en met photo's geïllustreerd. Het door ons waargenomen cytopathologische effect van mazelenvirus komt geheel overeen met de veranderingen die in andere weefselcultures werden waargenomen en beschreven. De waarneming van SCHWARZ en ZIRBEL, dat mazelenvirus ook groeit in bovine cellen, kunnen wij volledig bevestigen.

Ook vacciniavirus blijkt gemakkelijk in lensepitheel te groeien. Reeds na acht uur werden de eerste cytopathologische veranderingen, in de vorm van intracytoplasmatische insluitsels, waargenomen. Intracellulaire insluitsels zagen wij nimmer.

Wij kunnen zeggen, dat uit de in dit hoofdstuk beschreven experimenten is komen vast te staan: 1. het bovine lensepitheel is gevoelig voor infectie met de daarin besproken virussen; 2. tengevolge van de virusinfectie ontstaat in het lensepitheel een voor dat virus typisch cytopathologisch effect; 3. een bepaald virus is op deze wijze dus aantoonbaar door het daarbij behorende cytopathologische effect.

In hoofdstuk zes wordt aan de hand van de literatuur een overzicht gegeven van de structuur en de permeabiliteit van de lenskapsel. Voor de meeste stoffen blijkt de doorlaatbaarheid van de lenskapsel wel vast te staan. Publicaties over onderzoeken naar de doorlaatbaarheid voor virussen ontbreken echter tot nu toe.

In het zevende hoofdstuk wordt dan verder ingegaan op de vraagstelling of de lenskapsel doorlaatbaar is voor virussen. De proefopstelling, waarvan de apparatuur geïnspireerd werd door de „batch“-techniek van MERRIAM en KINSEY, wordt uitvoerig beschreven. Daarna volgt een beschrijving van de experimenten.

Begonnen werd met de contrôle van de proefopstelling. In een eerste reeks experimenten wordt nagegaan hoe overlevende kalflenzen zich in normaal medium gedragen. Het blijkt mogelijk, deze vrijwel steeds drie weken lang geheel helder te houden. In een tweede reeks experimenten wordt de vitaliteit van de overlevende lenzen nader getest: lensepitheel afkomstig van overlevende lenzen blijkt te kunnen uitgroeien tot een monocellulaire laag; voortkweken hiervan blijkt goed mogelijk op dezelfde wijze als lensepitheel van de verse kalflens. Geconcludeerd wordt dat de vitaliteit, van op deze wijze overlevende lenzen, tenminste gedurende de eerste tien dagen, voldoende is gewaarborgd.

Daarna volgt een beschouwing ter inleiding van de volgende experimenten over adsorptie en penetratie van virussen. Adsorptie- en penetratie-experimenten van FARNHAM en NEWTON, en van SCOTT, McLEOD en TOKUMARU worden besproken. Op de verwijdering van geadsorbeerd virus door neutraliserende antilichamen bevattend immuunserum wordt gewezen.

De op grond van deze overwegingen opgezette eigen experimenten,

waarbij de adsorptie en penetratie van virus voor de kalfslens wordt nagegaan, worden beschreven. Hierbij werd weer gebruik gemaakt van de mogelijkheid virus aan te tonen door groei in lensepitheelcultures, met het voor dit virus typische cytopathologische effect. Het blijkt dat adenovirus aan de lens wordt geadsorbeerd. Na verwijdering van aan de lens geadsorbeerd virus door middel van antiserum, blijkt de lens toch nog aantoonbaar adenovirus te bevatten, waaruit geconcludeerd wordt dat dit in de lens moet zijn gepenetreerd. Uit daarop volgende experimenten blijkt dat ook poliovirus type 1 in de lens penetreert.

SUMMARY

Following an introduction, in which the purpose of the experiment is described, is a review in the first chapter of the broad applicability of tissue culture in virology. Recently, the tissue culture has assumed the status of a major technic in the virus laboratory. Three circumstances accounted for its present importance: first the general recognition about 1950 that many viruses as they multiply produce degenerative changes in cultured cells, cytopathic effects, specific for their presence; the development of antibiotics and the inclusion of these substances in the medium; finally, the technic introduced by DULBECCO and VOLT for the preparation of suspensions of tissue cells by treatment with trypsin, to prepare a single sheet or monolayer of cells.

In the second chapter the technic for the cultivation of lens cells of the calf is described. The method of preparation and primary explantation is explained. Then follows a description of how a continuous cell-line is obtained.

In the third chapter our technic in making stained histological preparations of the cultivated epithelial cells of the lens is described. Preparations were made, using the direct method of fixing and staining the cells grown on a thin glass slide. Cells were fixed in CARNOY'S solution and stained with iron-haematoxylin-eosin after HEIDENHAIN. The method is described.

The fourth chapter deals with a critical review on the appearance of the lens cells in the stained preparation of normal cultures. On the basis of the study of some photographs the appearance of the nuclei and cytoplasm is reviewed. The influence of the concentration of the calf serum was investigated. Attempts to cultivate the cells in a growth-medium containing less than 20% calf serum were successful.

The influence of the hydrogen-ion concentration of the medium and of antibiotics upon the growth of cells is described.

Chapter five first deals with the inoculation of cultures with several viruses. Attention is drawn to the fact that propagation of viruses in cultures of epithelial cells of the lens is hardly mentioned in literature. VAN DER VEEN and HEYEN described cultivation of adenovirus in

epithelial cells of the lens, but did not examine stained preparations of the cultures.

Our own investigations on adenovirus, poliovirus, measles virus and vaccinia virus are described in detail.

Adenovirus type 3 and type 7 were inoculated in cultures of lens cells. The viruses caused cytopathic changes similar to those in HeLa cells and monkey kidney cells. It is not possible to distinguish the individual types by using this method. The cytopathic effects of adenoviruses in cultures of epithelial cells of the lens are described in detail with many illustrations.

Though many investigators suppose only cells of primate organs susceptible to poliovirus when grown in cultures, we have succeeded in cultivating poliovirus type 1 in lens cells of the calf in tissue culture. The virus caused a widespread cytopathic effect from the second to fifth day after primary inoculation. On subsequent passage, the same cytopathic changes were observed. In stained histological preparations the cytopathic changes of poliovirus resembled those in HeLa cells.

Then our investigations with measles virus are described. Before 1959 no cytopathic effect had been seen in bovine tissues tested. That year SCHWARZ and ZIRBEL succeeded in cultivating measles virus in bovine kidney tissue.

After the inoculation of measles virus in epithelial cells of the lens, there appeared sixty days afterwards, after two passages, a typical cytopathic effect. In the culture multinucleated giant cells appeared. These cells showed intranuclear acidophilic inclusion bodies and masses of eosinophilic material in the cytoplasm. We have described in detail the changes appearing in the tissue cells and photographed the stained preparations. Similar cytopathic effects have been observed in cultures of different tissues. We are therefore able to confirm the observations of SCHWARZ and ZIRBEL that measles virus grows in bovine tissue.

Vaccinia virus also has a great ability to grow in epithelial cells of the lens. In tissue cultures a cytopathic effect was visible within eight hours; inclusion bodies appeared in the cytoplasm. We never observed intranuclear inclusion bodies.

On the basis of the investigations described in this chapter, the following is established: 1. epithelial cells of the bovine lens are susceptible to infection with adenoviruses, poliovirus, measles virus and

vaccinia virus; 2. viral infections produce cytopathic changes within cultured epithelial cells of the lens thus providing an adequate criteria for their presence; 3. identification of the virus infecting the cells is possible by the typical cytopathic effects produced.

In chapter six on the basis of the study of the literature a general survey is given concerning the structure and permeability of the lens capsule. The permeability of the lens capsule to most substances is established. No references are available on investigations of the permeability of the capsule to viruses.

Chapter seven deals with investigations of the permeability of the lens capsule to viruses. The experiments were inspired on the „batch“-technic for in vitro culture of crystalline lenses, as described by MERIAM and KINSEY. Then follows a description of experiments.

We began with checking the procedures for the experiments. The behaviour of the surviving calf's lens in normal medium was first examined. The lenses remained clear for practically three weeks. In a second sequence of experiments the integrity and vitality of the surviving lenses were examined. We succeeded in cultivating cells from the surviving lenses. The morphology and growth of these cells was the same as in cultures from lenses prepared immediately after the death of the animal. It is concluded from this that the vitality of surviving lenses remains for at least ten days.

The studies on adsorption and penetration made by FARNHAM and NEWTON, and by SCOTT, McLEOD and TOKUMARU are discussed, in order to serve as an introduction for our experiments on adsorption and penetration of viruses. During the earliest phase of adsorption the virus is still accessible to antibody, and this initial phase is followed by penetration. With penetration, the virus becomes inaccessible to the action of antiserum.

On account of these considerations mentioned above, we started our own experiments to examine the adsorption and penetration of virus with reference to the lens of the calf. The possibility of identifying the virus by the specific cytopathic effects produced was again employed. There is no doubt that adenovirus is adsorbed by the lens. After neutralization by immune serum of virus adsorbed by the lens, we have succeeded in demonstrating that adenovirus, inaccessible to the action of antiserum, penetrates the lens.

The same experiments were repeated with poliovirus type I. It came out that this virus also penetrates the bovine lens.

LITERATUURLIJST

- Bahr, G. von:* Influence of calcium deficiency on the surviving rabbit's lens. *Acta Ophthal.*, 1940, 18: 170-189.
- Bakker, A.:* Eine Methode, die Linsen erwachsener Kaninchen ausserhalb des Körpers am Leben zu erhalten. *Graefe's Arch. Ophthal.*, 1936, 135: 581-592.
- *Ueber die Bedeutung der Ascorbinsäure (Vitamin C) für den Stoffwechsel der Linse.* *Graefe's Arch. Ophthal.*, 1936, 136: 166-171.
- *The action of Sulfanilamide on rabbit's lenses in vivo.* *Brit. J. Ophthal.*, 1947, 31: 216-219.
- Barski, G.:* Caractère spécifique de la lésion cellulaire causée in vitro par les virus du groupe APC et sa valeur diagnostique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 91: 614-622.
- Barski, G. et Cornefert, F.:* Aspects distinctifs des lésions cellulaires causées in vitro par différents types d'adénovirus. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94: 724-731.
- Bellows, J. G. and Chinn, H.:* The distribution of Sulfanilamide in the eye. *Brit. J. Ophthal.*, 1939, 23: 784-785.
- Bence-Jones:* gecit. uit Nordmann, *Biologie du cristallin*.
- Busacca:* gecit. uit Nordmann, *Biologie du cristallin*.
- Dische, Z. and Zil, H.:* Studies on the oxidation of cysteine to cystine in the lens proteins during cataract formation. *Amer. J. Ophthal.*, 1951, 34: 105.
- Dische, Z., Ehrlich, G., Munoz, C. and von Sallmann, L.:* The content of glutathione and nucleotides of the lens capsule and its relation to lens permeability. *Amer. J. Ophthal.*, 1953, 36: 54-64.
- Drouet, V.:* Etude d'un virus APC (Adénovirus) isolé d'un cas de pneumopathie mortelle. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, 93: 138-142.
- Dulbecco, R. and Vogt, M.:* Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exper. Med.* 1954, 99: 167-182.
- Dunham, W. B. and Ewing, F. M.:* Propagation of poliovirus in chick embryo cell cultures. I Cultivation of 3 virus types. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1957, 95: 637-639.
- Enders, J. F., Weller, T. H. and Robbins, F. C.:* Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science*, 1949, 109: 85-87.
- Enders, J. F.:* *Viral and Rickettsial infections of man*, 1952, Chap. 6.: 133-134. Lippincott. Co., Philadelphia.
- Enders, J. F. and Peebles, T. C.:* Cultivation of measles virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954, 86: 277.
- Enders, J. F., Peebles, T. C., Mc. Carthy, K. and Milovanovic, M.:* Measles Virus: A summary of experiments concerned with isolation properties and behaviour. *Am. J. Pub. Health*, 1957, 47: 275-282.
- Farnham, A. E. and Newton, A. A.:* The effect of some environmental factors on herpes virus grown in HeLa Cells. *Virology*, 1959, 7: 449-461.
- Fisher, T. N. and Ginsberg, H. S.:* Accumulation of organic acids by HeLa-cells infected with type 4 adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*: 1957, 95:

- vitro par différents types d'adénovirus. Ann. Inst. Pasteur, 1958, 95: 724-731.
- Brit. J. Ophthal., 1939, 23: 784-785.
- permeability. Amer. J. Ophthal., 1953, 36: 54-64.
- Farnham, A. E. and Newton, A. A.*: The effect of some xvironmental factors on 47-51.
- Francois, J.*: Les cataractes congénitales. Masson, Paris 1959.
- Friedenwald, J. S.*: Permeability of lens capsule to water, dextrose and other sugars. Arch. Ophthal., 1930, 4: 350-360.
- Permeability of lens capsule with special reference to etiology of senile cataract. Arch. Ophthal., 1930, 3: 182-193.
- Gifford, S. R., Lebensohn, J. E. and Puntenny, I. S.*: The permeability of the capsule of the lens. Arch. Ophthal., 1932, 8: 414-440.
- Givner and Gannon*: gecit. uit Nordhamm, Biologie du cristallin.
- Goldberger, J. and Anderson, J. F.*, 1911, experimental measles in the monkey. Gecit. uit Rivers and Horsfall, Viral and Rickettsial infection of man.
- Haan, J. de*: Le mode de croissance des cellules migratrices dans les cultures in vitro à irrigation permanent. Bull. d'histol. appliq. à la physiologie, 1927, 4: 293-317.
- Heuvel, J. E. A. van den*: Cytological aspects of the cristalline lens. Adv. Ophthal., 1956, 5: 54-182. S. Karger, Basel/New York.
- The behaviour of surviving lens epithelium. Ophthalmologica, 1957, 133: 447.
- Development of the cell nuclei in the lens. Ophthalmologica, 1957, 133: 440-447.
- Hilleman, M. R. and Werner, J. H.*: Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 85: 183-188.
- Huang, C. H.*: Titration and neutralization of the western strain of equine encephalomyelitis virus in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1942, 51, 396-398.
- Leber*, 1903: gecit. uit Nordmann, Biologie du cristallin.
- Lynn, J. W. and Morgan, H. R.*: Cytopathogenicity of animal viruses in vitro, A.M.A. Arch. Path., 1954, 57, 301-316.
- Magnus*, 1890: gecit. uit Nordmann, Biologie du cristallin.
- Monahan, R. H.*: Channels in the human lens capsule and their relationship to senile cataract. Amer. J. Ophthal., 1953, 36: 24-30.
- Morgan, Morton and Parker*: gecit. uit Paul, Cell and tissue culture.
- Merriam, F. C. and Kinsey, V. E.*: Studies on the cristalline lens: 1. Technic for in vitro culture of cristalline lenses and observations on metabolism of the lens. Arch. Ophth., 1950, 43: 979-988.
- Milovanovic, M. V., Enders, J. F. and Mitus, A.*: Cultivation of measles virus in human amnion cells and in developing chick embryo. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 95: 120-127.
- Nataf, R., Lépine, P. et Bonamour, G.*: Oeil et Virus. Masson, Paris, 1960.
- Nordmann, J.*: Biologie du Cristallin. Masson, Paris, 1954.
- Pau, H.*: Warum beginnt bei der Permeabilitätskatarakt die Trübung unter den hinteren Kapsel. Ber. Dtsch. Ophthal. Ges., 1950, 56: 240-243.
- Paul, J.*: Cell and tissue culture. Livingstone Ltd., Edinburgh/London, 1960.
- Pearse, A. G. E.*: Histochemistry. Churchill, London, 1960.
- Pierce, H. F., Friedenwald, J. S. and Freeman, D.*: The gascontent of the intra-

- ocular fluid. *Am. J. Physiol.*, 1933, 104: 553-556.
- Ploeg, G. C. J. van der*: Infecties met adeno-virussen bij kinderen. Diss. Nijmegen 1959.
- Plotz, 1938*: gecit. uit Rivers and Horsfall, *Viral and Rickettsial infections of man*.
- Rake, G., Shaffer, M. F. and Jones, H. P.*: Studies on measles. III. The use of tissue culture in propagation of measles virus. *J. Infect. Dis.*, 1941, 69: 65-69.
- Reiser, K. A.*: Studien zur Sulfanilamidetherapie. *Klin. Mbl. Augenheilk.* 1952, 120: 561-574.
- Rivers, T. M. and Horsfall, F. L.*: *Viral and Rickettsial infections of man*. Pitman, London, 1959.
- Robbins, F. C. and Enders, J. F.*: Tissue techniques in the study of animal viruses. *Amer. J. M. Sc.*, 1950, 220: 316-338.
- Romeis, B.*: *Taschenbuch der Mikroskopischen Technik*. Oldenbourg/München, 1948.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K. Parrott, R. H. and Ward, T. G.*: Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1953, 84: 570-573.
- Rubin, H. and Franklin, R. M.*: On the mechanism of Newcastle disease virus neutralization by immune serum. *Virology*, 1957, 3: 84-95.
- Ryden, F. W. and Randall, C. C.*: The growth cycle of vaccinia in HeLa-cells correlated with concurrent cellular changes. *Am. J. Path.*, 1957, 3: 367-384.
- Sallmann, L. von*: Experimental studies on early lens changes after roentgen irradiation. I. Morphological and cytochemical changes. *Arch. Ophthalm.*, 1951, 45, 149-164.
- Salzmann, 1912*: gecit. uit Nordmann, *Biologie du cristallin*.
- Sanders, M., Kiem, I. and Lagunoff, D.*: Cultivation of viruses. *A.M.A. Arch. Path.* 1953, 56: 148-225.
- Schwarz, A. J. F. and Zirbel, L. W.*: Propagation of measles virus in non-primate tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1959, 102: 711-714.
- Scott, T. F. N., McLeod, D. L. and Tokumaru, T.*: A biologic comparison of two strains of herpesvirus hominis. *J. Immun.*, 1961, 86: 1-12.
- Sebruyens, M.*: Ultrastructure de la cornée et du cristallin. *Ann. Ocul.*, 1950, 183: 483-489.
- Sheffield, F. W. and Churcher, G. M.*: The serial propagation of poliomyelitis viruses in cells derived from rabbit embryo kidney. *Brit. J. Exp. Path.*, 1957, 38: 155-159.
- Topacio, T. and Hyde, R. R.*, 1932: gecit. uit Rivers and Horsfall.
- Ulrich, 1898*: gecit. uit Nordmann, *Biologie du cristallin*.
- Veen, J. van der en Heyen, C. F. A.*: Lens cells of the calf in continuous culture. *Nature*, 1959, 183: 1137-1138.
- Versteeg, J.*: Differentiatie van virussen op grond van het cytopathogeen effect in celcultures. Diss. Leiden 1959.
- Warren, J. and Cutchins, E. C.*: General characteristics and viral susceptibility of bovine embryonic tissue cultures. *Virology*, 1957, 4: 297-304.

STELLINGEN

I

Voor een grondige bestudering van het cytopathologische effect van verschillende virussen in gecultiveerd lensepitheel is het maken van gekleurde preparaten noodzakelijk.

II

Voor het aantonen van een typisch cytopathologisch effect van mazelenvirus in bovine weefselcultures is een langdurige periode van observatie noodzakelijk.

III

De groeiwijze van lensepitheelcellen in een medium met minder dan 20% serum onderscheidt zich van de groeiwijze in een rijker medium.

IV

Het verschillende cytopathologische effect van twee stammen van herpesvirus hominis, maakt een onderzoek naar mogelijk daarmede samenhangend verschillend beloop van een keratitis herpetica wenselijk.

(Scott, McLeod and Tokumaru, J. Immun. 1961, 86: 1-12).

V

De oogheelkundige opleiding van de aanstaande huisarts dient meer gericht te zijn op het verlenen van deskundige eerste hulp bij oogletsels dan op het behandelen van oogziekten.

VI

Bij een diepe amblyopie neme men nooit een centrale fixatie aan.

VII

Bij het arteriitis temporalis syndroom verrichte men steeds resectie van de art. temporalis.

(Pestalozzi und Martenet, Ophthalmologica, 1961, 141: 155-180).

VIII

Haemophilus aegypticus (bacil van Koch-Weeks) moet mede op grond van het gedrag in het dierexperiment onderscheiden worden van *Haemophilus influenzae*.

(Orfila et Courden, Ann. Inst. Pasteur 1961, 2: 252-256).

IX

Automatisering van sterilisatieprocessen van instrumenten en materiaal in ziekenhuizen is noodzakelijk en dient gezien de uiteenlopende aard van de instrumenten per afdeling te geschieden.

X

De controle over langere tijd van retinopathie bij lijdens aan diabetes en hypertensie is slechts door middel van fundusfotografie met nauwkeurigheid mogelijk.

XI

De verdraagbaarheid van implantaten van kunststof binnen het oog dient gedurende enkele jaren bij proefdieren te worden nagegaan, alvorens toepassing bij de mens verantwoord kan worden genoemd.

XII

Bij fracturen van de oogkas behoort steeds een onderzoek naar de functie van het oog en het bewegingsapparaat van het oog te worden verricht.

XIII

Een aantal waarnemingen gedaan over het endotheel van de cornea berust op foutieve fixatie.

VIX

Het voorschrijven van contactglazen dient uitsluitend door een oogarts te geschieden.

